

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



TESIS DOCTORAL

**Identificación de compuestos activadores,
proteínas moduladoras y sustratos de la MAPK
Slt2 de la ruta de integridad celular de
*Saccharomyces cerevisiae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Esmeralda Alonso Rodríguez

DIRECTORES

**María Molina Martín
Humberto Martín Brieva**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**Identificación de compuestos activadores, proteínas -
moduladoras y sustratos de la MAPK Slt2 de la ruta de -
integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por

Esmeralda Alonso Rodríguez -

Directores

María Molina Martín -

Humberto Martín Brieva -

Madrid, 2016

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- **BIO2010-22369-C02-01**: “*Saccharomyces cerevisiae* como modelo para el estudio de la señalización eucariótica y su aplicación al diseño de bioensayos de cribado farmacológico”, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2010-2014).

- **S2011/BDM2014**: “Programación de circuitos microbianos en medicina protectora y terapéutica”, subvencionado por la Comunidad de Madrid (2010-2014).

- **BIO2013--44112-P**: “Identificación de nuevos componentes y reconfiguración de circuitos de señalización en *Saccharomyces cerevisiae*”, subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2014-2016).

Así como a la concesión de las siguientes ayudas:

- **Beca de Formación de Personal Investigador (FPI)** concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación durante el periodo 2011-2015.

- **Ayuda para la realización de Estancias Breves dentro del programa FPI**, concedida para la estancia temporal en el laboratorio del Dr. Jürgen Heinisch, *The University of Osnabrück*, Alemania, 2014.

A mi familia

A Jorge

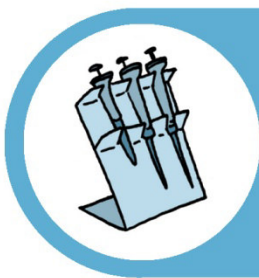
Quiero comenzar agradeciendo esta Tesis a mis directores Humberto y María por la oportunidad que me han dado para formarme junto a ellos, pues no sólo he madurado científicamente sino también como persona. Me han enseñado a no tener miedo al fracaso, a no rendirme, a buscar nuevas formas para conseguir un objetivo y a trazar mis propios caminos sin perder nunca la sonrisa. Gracias por toda la dedicación y el esfuerzo mostrados en este trabajo. Quisiera mencionar también a Víctor, que con su entusiasmo ha contribuido enormemente a esta Tesis. ¡Gracias “jefes” por hacerme disfrutar con la Ciencia!

Del mismo modo quisiera dar las gracias a todos los que forman parte del Departamento de Microbiología II por estar siempre dispuestos a echar una mano cuando se les necesita. En especial a todos mis compañeros de la U3, ya que esta Tesis es en parte de ellos, por acogerme haciéndome sentir como en casa, por transmitirme sus conocimientos, por todos sus consejos, por su tiempo para solucionar los pequeños problemas del día a día y ayudarme siempre a seguir mejorando. También debo reconocer aquí la ayuda de los chicos de la U4, sin la cual muchos de estos experimentos no habrían sido posibles. Gracias a todos por esa complicidad que nos ha permitido crear un buen ambiente de trabajo y conformar este maravilloso equipo con el que sé que puedo contar tanto dentro como fuera del laboratorio. ¡Muchas gracias por acompañarme en este viaje!

Quisiera expresar mi agradecimiento a Jürgen Heinisch por darme la oportunidad de realizar una estancia científica en su laboratorio y enseñarme otra forma de hacer Ciencia y a toda la gente de su departamento por hacerme sentir parte del grupo.

Me gustaría hacer extensivo este agradecimiento a todos los que han formado parte de mi vida académica, por confiar en mí, orientarme y animarme a dedicar mi vida a la investigación, ayudando así a ser lo que soy hoy.

Por último, a mi familia y amigos que aunque no entiendan muy bien de que va todo esto, siempre han confiado en mis decisiones y posibilidades, me han apoyado y no han dejado que nunca me rinda. Y a Jorge por estar siempre ahí y no fallarme nunca.



ÍNDICE

ÍNDICE -	1-8 -
----------	-------

ABREVIATURAS -	9-14 -
----------------	--------

RESUMEN -	15-22 -
-----------	---------

INTRODUCCIÓN	17
OBJETIVOS	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
1. Estudio de la morfología celular y la estructura del anillo de septinas en los mutantes <i>gas1Δ slt2-as</i> y <i>fks1Δ slt2-as</i> tras la inhibición de <i>Slt2</i>	18
2. Búsqueda de nuevos sustratos de <i>Slt2</i> mediante ensayos de tiofosforilación in vitro con <i>Slt2-as</i>	18
3. Búsqueda de nuevos compuestos activadores de la ruta CWI mediante el uso de un circuito genético de retroalimentación positiva de la ruta CWI (IPAC)	19
4. Rastreo genético basado en el uso del IPAC para la identificación de nuevas proteínas moduladoras de la señalización a través de la ruta CWI	20
CONCLUSIONES	20

SUMMARY	23-30 -
---------	---------

INTRODUCTION	25
OBJETIVES	25
RESULTS AND DISCUSSION	26
1. Study of cell morphology and structure of the septins ring in the <i>gas1Δ slt2-as</i> and <i>fks1Δ slt2-as</i> mutants after inhibition of <i>Slt2-as</i>	26
2. Screening for new substrates of <i>Slt2</i> by in vitro thiophosphorylation assays with <i>Slt2-as</i>	26
3. Screening for new compounds activators of CWI pathway by using a genetic positive feedback circuit of the CWI pathway (IPAC)	27
4. Genetic screening based on the use of IPAC for identifying new modulation proteins of the signaling of CWI pathway	28
CONCLUSIONS	28

INTRODUCCIÓN - 31-76 -

1. - LA PARED CELULAR DE LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
1.1. β -1,3 glucano.....	35
1.2. β -1,6 glucano.....	37
1.3. Quitina.....	38
1.4. Manoproteínas	40
2. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKs EN -	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2.1. Ruta de respuesta a alta osmolaridad/glicerol (HOG)	42
2.2. Ruta de integridad celular (CWI)	46
2.2.1. Sensores.....	48
2.2.2. RHO1 Y PKC1	49
2.2.3. Módulo de MAPKs	52
2.2.4. Factores de transcripción	54
3. - INTERRELACIÓN DE LA RUTA CWI CON DIVERSOS COMPONENTES Y PROCESOS -	
ESENCIALES EN LA MORFOGÉNESIS CELULAR.....	58
3.1. Citoesqueleto de actina.....	58
3.2. Pkh1/Pkh2.....	60
3.3. Citoquinas y anillo de septinas	62
3.4. Fosfoinosítidos.....	67
3.5. Tráfico intracelular de membranas.....	70
4. - UTILIZACIÓN DE PROTEÍN QUINASAS SENSIBLES A ANÁLOGOS DE ATP COMO -	
MÉTODO PARA SU ESTUDIO.....	73

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS - 77-80 -

MATERIALES Y MÉTODOS - 83-110 -

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	83
2. CONDICIONES DE CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	87
2.1. Medios utilizados y condiciones de cultivo.....	87
2.2. Determinación del crecimiento	87
2.3. Cultivo y recogida de células de levaduras	88

3. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	88
3.1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	89
3.2. Mutagénesis dirigida.....	92
3.3. Plásmidos utilizados.....	93
3.4. Plásmidos generados en este trabajo.....	94
3.5. Generación de cepas mutantes de delección de <i>S. cerevisiae</i>	95
3.6. Generación de cepas haploides de <i>S. cerevisiae</i>	96
4. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE MICROARRAYS DE DNA.....	97
4.1. Extracción de RNA.....	97
4.2. Síntesis, marcaje e hibridación del cDNA.....	97
4.3. Análisis de imagen, procesamiento de datos y métodos estadísticos.....	98
4.4. RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	98
5. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES COMPUESTOS.....	99
5.1. Ensayo de halo.....	99
5.2. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones decimales seriadas.....	101
5.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido.....	101
5.4. Ensayo de secreción de carboxipeptidasa y lisis celular.....	102
6. - RASTREO A GRAN ESCALA SOBRE UNA SUB-COLECCIÓN DE MUTANTES DELECCIONADOS - EN GENES NO ESENCIALES DE LEVADURA.....	102
7. - ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y TINCIÓN DE ACTINA, PARED CELULAR Y MEMBRANAS.....	104
8. - ENSAYO DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.....	105
9. - DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	105
9.1. Obtención de extractos y preparación de muestras.....	105
9.2. Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	106
9.3. Inmunodetección.....	106
10. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES FUSIONADAS A GST EN <i>E. coli</i>	107
11. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GST- <i>SLT2-AS</i> ACTIVO EN <i>S. cerevisiae</i>	108
12. ENSAYO QUINASA CON <i>slt2-as</i> Y ATP γ S SOBRE PROTEÍNAS RECOMBINANTES - FUSIONADAS A GST.....	109
13. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.....	109

1. - CARACTERIZACIÓN DE UNA VERSIÓN DE Slt2 SENSIBLE A ANÁLOGOS DE -	
INHIBIDORES DE QUINASAS	113
1.1. La versión de Slt2 sensible a análogos de inhibidores de quinasas es funcional	113
1.2. Slt2-as es inhibible por análogos de inhibidores de quinasas.....	113
1.3. Estudio de mutantes sintéticos letales con <i>slt2Δ</i>	117
1.3.1. - Estudio de la inhibición de <i>slt2-as</i> en mutantes <i>gas1Δ slt2-as</i> y <i>fks1Δ slt2as</i>...	119
1.3.1.1. La inhibición de Slt2 en los mutantes <i>gas1Δ slt2-as</i> y <i>fks1Δ slt2as</i> provoca un incremento en el porcentaje de células con yemas pequeñas	119
1.3.1.2. El citoesqueleto de actina no está alterado en las cepas <i>slt2-as</i> , <i>gas1Δ slt2-as</i> y <i>fks1Δ slt2as</i> tras la inhibición de Slt2.....	121
1.3.1.3. La inhibición de Slt2 no altera la localización del anillo de miosina en los mutantes <i>slt2-as</i> o <i>gas1Δ slt2-as</i>	122
1.3.1.4. La pérdida de actividad de Slt2 altera la localización de la septinas Cdc10 en los mutantes <i>gas1Δ slt2-as</i> y <i>fks1Δ slt2as</i>	122
1.3.1.5. En los mutantes <i>nbp2Δ slt2-as</i> , <i>swi4Δ slt2as</i> , <i>pho85Δ slt2-as</i> y <i>ppz1Δ slt2as</i> la inhibición de Slt2 no altera la localización de Cdc10.....	124
1.3.1.6. Pkc1 y Wsc1 no presentan alterada su localización en mutantes <i>slt2-as</i> , <i>gas1Δ slt2-as</i> y <i>fks1Δ slt2as</i> tras inhibir la actividad catalítica de Slt2	125
1.4. Utilización de la versión de Slt2 sensible a análogos de quinasas para -	
identificar sustratos de esta MAPK	126
1.4.1. - GST-Slt2-as es funcional y capaz de utilizar análogos de quinasas.....	126
1.4.2. - GST-Slt2-as tiofosforila <i>in vitro</i> las proteínas Rlm1 y Msg5	128
1.4.3. - Identificación de nuevos sustratos de Slt2	130
1.4.3.1. La eliminación de los posibles sitios de fosforilación por MAPKs en Rcn2 y Caf20 impide su tiofosforilación por Slt2-as.....	134
1.4.3.2. Rcn2, Caf20 y Gga1 interaccionan con Slt2	137
1.4.3.3. La delección de <i>GGA2</i> , parálogo de <i>GGA1</i> , en el mutante <i>slt2Δ</i> incrementa la sensibilidad a estrés sobre la pared celular.....	138
1.4.3.4. La sobreexpresión de <i>RCN2</i> , <i>CAF20</i> y <i>GGA1</i> no complementan la sensibilidad de <i>slt2Δ</i> a compuestos que activan la ruta CWI	140
1.4.3.5. Slt2-as tiofosforila Rcn1.....	140
1.4.3.6. Slt2 participa en el tráfico de proteínas a través de la vía CPY	142

2. - CARACTERIZACIÓN DE UN CIRCUITO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL DE LA RUTA CWI DE - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y SU APLICACIÓN EN LA BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS - QUE ACTIVAN LA RUTA Y DE COMPONENTES REGULADORES	144
2.1. Construcción de plásmidos portadores del circuito de amplificación de la - señal de la ruta de integridad celular (IPAC)	144
2.2. La estimulación de la ruta CWI conduce a la inhibición del crecimiento - en cepas portadoras del IPAC	145
2.3. El IPAC promueve un incremento de la señalización a través de la ruta CWI.....	146
2.4. Rastreo de posibles activadores de la ruta CWI mediante el IPAC.....	148
2.4.1. - La neomicina, el EDTA, el cloruro de litio, el SDS, la difenilhidramina, el cloruro de cobalto, el cloruro de zinc y el clotrimazol activan la ruta CWI.....	150
2.4.2. - Análisis del efecto del clotrimazol sobre la ruta CWI.....	151
2.4.2.1. Comparación del efecto sobre la ruta CWI del clotrimazol con otros antifúngicos.....	151
2.4.2.2. En ausencia de Slt2 el clotrimazol induce la fosforilación de Hog1.....	152
2.4.2.3. El cambio de movilidad de Slt2 provocada por el clotrimazol es dependiente de su fosforilación por Mkk1/2 y de su propia actividad catalítica	153
2.4.2.4. La mutación en el posible sitio de fosforilación por MAPK de Slt2 no impide la aparición de la doble banda observada en presencia de clotrimazol.....	154
2.4.2.5. La fusión de epítomos al extremo carboxi-terminal de Slt2 impide el cambio de movilidad provocada por el clotrimazol.....	155
2.4.3. - Análisis del efecto de la neomicina sobre la ruta CWI	156
2.4.3.1. Estudio comparativo del efecto de la neomicina frente a otros inhibidores de síntesis proteica en relación a la ruta CWI.....	156
2.4.3.2. La neomicina provoca fragmentación vacuolar y acelera la entrada de FM4- 64 hacia las vacuolas	159
2.4.3.3. La neomicina no altera el citoesqueleto de actina	160
2.4.3.4. Estudio de la sensibilidad a neomicina de mutantes relacionados con la pared celular, la ruta CWI y la ruta HOG	161
2.4.3.5. Identificación de proteínas implicadas en la activación de la ruta CWI en respuesta a neomicina	163
2.4.3.6. Estudio de la respuesta transcripcional global a neomicina	165
2.5. Identificación de nuevos componentes moduladores de la ruta de integridad - celular.....	173

2.5.1. - Análisis de interacciones genéticas con el IPAC para identificar genes relacionados con la ruta CWI	173
2.5.2. - Uso del circuito IPAC en la identificación de genes relacionados con la ruta CWI en una sub-colección de mutantes de señalización y apoptosis	178
2.5.3. - Los mutantes <i>scp160Δ</i> , <i>bud27Δ</i> y <i>sic1Δ</i> presentan cortada la activación de la ruta en presencia de rojo Congo, zimoliasa y SDS	184
2.5.4. Estudio de Scp160 como posible sustrato de Slt2	186
2.5.4.1. La sobreexpresión de Scp160 no suprime en fenotipo de un mutante <i>slt2Δ</i>	186
2.5.4.2. El fragmento amino-terminal de Scp160 (1-107) es tiofosforilado por Slt2-as en un ensayos quinasa <i>in vitro</i>	186
2.5.4.3. Scp160 no interacciona con Slt2 en ensayos de copurificación.....	188

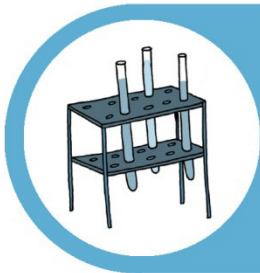
DISCUSIÓN - 189-213 -

1. - APLICACIONES DE UNA VERSIÓN DE SLT2 SENSIBLE A ANÁLOGOS DE INHIBIDORES DE PROTEÍN QUINASAS.....	191
1.1. Estudio del efecto de la inhibición de Slt2-as en mutantes sintéticos letales - con <i>slt2Δ</i>	192
1.2. La utilización de Slt2-as ha permitido identificar a Caf20, Rcn2 y Gga1 como - nuevos sustratos de esta MAPK	197
2. - CIRCUITO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL DE LA RUTA CWI	202
2.1. Identificación de nuevos compuestos activadores de la ruta CWI	204
2.2. El circuito IPAC permite identificar componentes moduladores de la ruta CWI.....	210

CONCLUSIONES - 215-218 -

BIBLIOGRAFÍA - 219-242 -

ANEXOS - 243-246 -

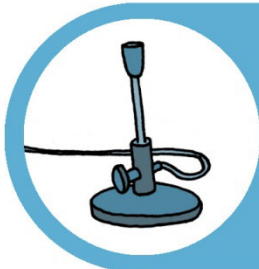


ABREVIATURAS

Δ	Delección
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP	Fosfatasa alcalina
ATP	Adenosín trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de suero bovino
°C	Grado centígrado
CAMK	Quinasa dependiente de Ca ²⁺ /Calmodulina
CD	<i>Common Docking</i>
CDK	Quinasa dependiente de ciclinas (<i>Cyclin Dependent Kinase</i>)
cDNA	DNA complementario
CFW	Blanco de Calcoflúor
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPY	Carboxipeptidasa
CRD	<i>Cysteine Rich Domain</i>
cRNA	RNA complementario
CS	Quitin sintasa
CWI	Ruta de Integridad Celular (<i>Cell Wall Integrity</i>)
CWP	Proteínas de la pared celular (<i>Cell Wall Proteins</i>)
DIC	Microscopia diferencial de contraste de interferencia
DMB PP1	Dimetilbencil-pirazol-pirimidina 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato
D.O.	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EE	Endosomas tempranos
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ER	Retículo Endoplásmico
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
ERSU	<i>ER Stress Surveillance</i>
ET	Etanolamina
FM4-64	N-(3-trietilamoniopropil)-4-(p-dietilaminofenilhexatrienil) piridinio dibromuro
GAP	Proteína activadora de GTPasa (<i>GTPase Activating Protein</i>)
GEF	Factor intercambiador de GTP (<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)

GlcNAc	N-acetil-glucosamina
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GS	Glucan sintasa
GST	Glutation S-transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i>
IPAC	Circuito de amplificación de la señal de la ruta CWI (<i>circuit amplification pathway integrity</i>)
IPTG	Isopropil-β-D-galactopiranosido
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KRE	<i>Killer toxin resistant</i>
LE	Endosomas tardíos
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i>
MAPKKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i>
MEK	<i>MAPK ERK Kinase</i>
ME	Mercaptoetanol
MKP	<i>MAPK Phosphatase</i>
MVB	Cuerpos multivesiculares
NAG	N-acetil-glucosamina
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
nm	Nanómetros
o/n	Durante la noche (<i>overnight</i>)
ONPG	Orto-nitro fenil-β-D galactopiranosido
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>PoliAcrilamide Gel Electrophoresis</i>)
PAK	<i>p21 Activated Kinase</i>
pb	Pares de bases
PBS	Buffer Salino Fosfato (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDK	<i>3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase</i>
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de Hidrógeno
PH	Dominio de homología con pleckstrina (<i>Pleckstrin homology</i>)

PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PM	Membrana plasmática (<i>plasmatic membrane</i>)
PMSF	<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
PRE	<i>Pheromone Response Element</i>
PtdIns	Fosfatidilinositol
PtdInsGlcN	Fosfatidilinositol-glucosamina
PSA	Persulfato amónico
PTM	Modificación postraducciona (<i>Post Translational Modification</i>)
RC	Rojo Congo
RE	Endosomas de reciclajes
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Retrotranscripción inversa asociada a PCR cuantitativa en tiempo real
SBF	<i>Swi-Binding Factors</i>
SD	Medio sintético de crecimiento de levaduras con glucosa
SDS	Docecil Sulfato Sódico
SG	Medio sintético de crecimiento de levaduras con galactosa
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SH3	<i>Src Homology 3</i>
<i>slt2-as</i>	Sl _t 2 sensible a análogos de ATP
SP	Septo primario
SR	Medio sintético de crecimiento de levaduras con rafinosa
STR	Residuos de Ser/Thr
STRE	<i>Stress Response Element</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related MOdifier</i>
TAE	Solución Tris-acetato EDTA
TEMED	Tetrametiletilenediamina
TGN	<i>trans</i> -Golgi
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
WT	Cepa silvestre (<i>Wild Type</i>)
YPD	Medio rico de crecimiento de levaduras (<i>Yeast extract peptone dextrose</i>)
YPG	Medio rico de crecimiento de levaduras con galactosa (<i>Yeast extract peptone galactose</i>)
ZL	Zimoliasa



RESUMEN

Título: Identificación de compuestos activadores, proteínas moduladoras y sustratos de la MAPK Slt2 de la ruta de integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Introducción

Una propiedad fundamental de toda célula es su capacidad de detectar cambios en las condiciones ambientales, y actuar adecuadamente frente a ellos para así adaptarse. En este proceso son determinantes las rutas de transducción de señales mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). En la parte final de estas rutas, donde opera el módulo de MAPKs formado por tres proteínas quinasas, la señal se transmite de una a otra por fosforilaciones secuenciales, permitiendo así la amplificación de las señales iniciadas en la superficie celular (Cargnello *et al.*, 2012). Una vez activada, la MAPK fosforila a distintos elementos entre los cuales se encuentran factores de transcripción (Chen y Thorner, 2007). Así se genera una respuesta adecuada que generalmente implica una modificación de la expresión génica, junto con otros cambios en la fisiología celular. Las MAPKs regulan una gran variedad de procesos biológicos esenciales como el metabolismo, la morfología celular o la progresión del ciclo celular. Debido a que muchos de los componentes de estas rutas y mecanismos por los cuales operan están conservados, la investigación realizada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha proporcionado gran parte del conocimiento que se tiene actualmente de las rutas de MAPKs de organismos eucarióticos. En *S. cerevisiae*, una de estas rutas es la de integridad celular (CWI, *Cell Wall Integrity*), en la que la MAPK Slt2 es un componente fundamental activado por las MAPKs Mkk1 y Mkk2. Esta ruta se activa por la alteración de la pared celular y conduce a la fosforilación del factor de transcripción Rlm1, responsable de la mayor parte de la respuesta transcripcional que se genera como mecanismo compensatorio para salvaguardar la integridad de esta estructura externa esencial (Levin, 2011). Esta ruta es de gran importancia, ya que la pared celular de los hongos es una buena diana farmacológica, al no estar presente en células humanas.

Objetivos

Nuestros objetivos se han orientado al desarrollo de nuevas herramientas de estudio de la ruta CWI. De forma concreta, a:

- La generación y caracterización de una versión de Slt2 sensible a análogos de ATP (*slt2-as*), con el fin de estudiar el fenotipo resultante de la inhibición de la ruta CWI en mutantes sintéticos letales con *slt2Δ* e identificar nuevos sustratos de esta MAPK.

- La utilización de un circuito de amplificación de la señal de la ruta de integridad celular (IPAC) para identificar nuevos estímulos y componentes moduladores de esta ruta.

Resultados y discusión

1. Estudio de la morfología celular y la estructura del anillo de septinas en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* tras la inhibición de Slt2-as

Mediante la sustitución del glutámico 108 de Slt2 por glicina hemos generado una versión de Slt2, denominada Slt2-as, que es sensible a análogos de inhibidores de quinasas. La disponibilidad del alelo *slt2-as* nos ha permitido estudiar el efecto de la inhibición de Slt2 en diversos mutantes sintéticos letales con la mutación *slt2Δ*. Entre los mutantes ensayados, solo los dobles mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* muestran una dependencia total de Slt2 en ausencia de estrés. Los mutantes *gas1Δ* y *fks1Δ* están afectados en la biosíntesis del glucano de la pared celular (Dijkgraaf *et al.*, 2002; Lagorce *et al.*, 2003). La inhibición de Slt2 en estos mutantes provoca un gran incremento en la proporción de células con yema pequeña, lo que sugiere una parada del ciclo celular, probablemente en la fase S-G2. Además, provoca la deslocalización de la septina Cdc10, lo cual indica que la integridad del anillo de septinas en esta situación depende de la MAPK Slt2.

2. Búsqueda de nuevos sustratos de Slt2 mediante ensayos de tiofosforilación *in vitro* con Slt2-as.

La modificación del bolsillo catalítico también les permite a las quinasas-as unir análogos voluminosos de ATP que tienen sustituido el Y-fosfato por tiofosfato y transferir este tiofosfato a las proteínas sobre las que actúan. En este trabajo comprobamos que Slt2-as, en ensayos quinasa *in vitro*, es capaz de utilizar con alta especificidad N⁶-(feniletil)-ATP-Y-S para tiofosforilar sustratos conocidos de esta MAPK, como el factor de transcripción Rlm1 y la MAPKK Mkk1. Con esta metodología pudimos comprobar asimismo que Slt2-as tiofosforila tanto la región regulatoria amino-terminal como la catalítica carboxi-terminal de la fosfatasa Msg5. En un estudio de fosfoproteómica previo se identificaron posibles sustratos de Slt2, ya que aparecían fosforilados en condiciones de hiperactivación de la ruta CWI en sitios S/TP de fosforilación por MAPKs (Mascaraque *et al.*, 2013). Tras ensayar 15 de ellos, mostramos que Slt2-as tiofosforila Caf20, Rcn2 y Gga1. El hecho de que Slt2 interactúe con estas proteínas apoya la idea de que son sustratos fisiológicos. La tiofosforilación de Caf20, un represor de la traducción (Altmann *et al.*, 1997), ocurre en la treonina 102 y proporciona nuevos indicios acerca de cómo la levadura

podría regular la traducción en respuesta a distintos tipos de estrés. Por otra parte, Rcn2, junto con su parólogo Rcn1, regulan la ruta de la calcineurina (Mehta *et al.*, 2009). Slt2 tiofosforila ambas proteínas, lo que sugiere que estos reguladores podrían servir de nexo entre la ruta CWI y la señalización por Ca^{2+} en *S. cerevisiae*. Por último, Gga1 es una proteína adaptadora asociada al aparato de Golgi e implicada en tráfico de Golgi a vacuola (Miller *et al.*, 2003). La delección de *GGA2*, parólogo de *GGA1*, incrementa la sensibilidad del mutante *slt2Δ* a compuestos que activan la ruta CWI. Estos resultados sugieren que una regulación adecuada del tráfico a vacuola es necesaria para la integridad de la pared celular. Además, observamos que la delección de *SLT2* provoca la secreción anormal de carboxipeptidasa Y (CPY) en el mutante *gga2Δ*, lo que indica que Slt2 podría participar en el tráfico a través de la vía de la CPY mediante la fosforilación de Gga1.

3. Búsqueda de nuevos compuestos activadores de la ruta CWI mediante el uso de un circuito genético de retroalimentación positiva de la ruta CWI (IPAC)

Hemos desarrollado un circuito genético de retroalimentación positiva de la ruta CWI denominado IPAC (*Circuit Amplification Pathway Integrity*), compuesto por el alelo hiperactivo de una de las MAPKK de la ruta CWI, *Mkk1*^{S386P} (Watanabe *et al.*, 1995), bajo el control del promotor de *MLP1*, uno de los genes que más se induce en condiciones de activación de la ruta (Arias *et al.*, 2011). Tras la estimulación de la ruta CWI, este circuito produce una amplificación continua de la señal transmitida por la ruta, que resulta letal y convierte a las células que lo portan en hipersensibles a daños en la pared celular. Basándonos precisamente en esta hipersensibilidad, decidimos rastrear una serie de compuestos identificando la neomicina, el clotrimazol, el SDS, el EDTA, el cloruro de Litio, el cloruro de Zinc, el cloruro de Cobalto y la difenilhidramina como posibles activadores de la ruta, lo cual se confirmó al comprobar que el tratamiento con todos ellos incrementaba la fosforilación de Slt2. El clotrimazol es un antifúngico que inhibe la lanosterol-14-desmetilasa, enzima necesaria para la biosíntesis del ergosterol de la membrana celular de los hongos (Helmick *et al.*, 2005). En este trabajo hemos detectado que el clotrimazol provoca la aparición de una banda de menor movilidad electroforética que Slt2 que es reconocida por anticuerpos frente a Slt2 y frente a su forma doblemente fosforilada, de manera dependiente de su activación y de su propia actividad catalítica, pero no causada por autofosforilación. Por otro lado, el clotrimazol, en ausencia de Slt2, activa la ruta de respuesta a alta osmolaridad. El estudio de este fenómeno puede ser de gran utilidad para conocer mejor los mecanismos que aseguran la especificidad de la señalización a través de la ruta CWI. La neomicina, aminoglucósido que inhibe la síntesis de

proteínas al unirse a la subunidad pequeña de los ribosomas (Tuite y McLaughlin, 1984), provoca la activación de la ruta CWI de manera dependiente de elementos de esta ruta y de la ruta HOG, así como de la proteína quinasa Pkh1 y de Slm1, proteína que presenta dominios de unión a PtdIns-4,5P₂ y del adaptador Nbp2. Es interesante reseñar que ningún otro de los inhibidores de la síntesis proteica ensayados es capaz de activar la ruta CWI, por lo que la neomicina debe afectar a alguna función o estructura de las levaduras de forma específica. Además de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, en respuesta a neomicina se encuentran también diferencialmente expresados genes relacionados con la respuesta a estrés, señalización y biosíntesis de la pared, así como genes implicados en el metabolismo lipídico. Debido a que este aminoglucósido se une con alta afinidad al PtdIns-4,5P₂ de la membrana de células superiores (Schacht, 1976; Lodhi *et al.*, 1979), la activación de la ruta podría ser debida a una alteración en la disponibilidad de fosfoinosítidos de la membrana plasmática, o consecuencia indirecta de la alteración de algún proceso celular regulado por PtdIns-4,5P₂, como la endocitosis. De hecho, la neomicina acelera el proceso de entrada del colorante vital FM4-64 hacia la vacuola.

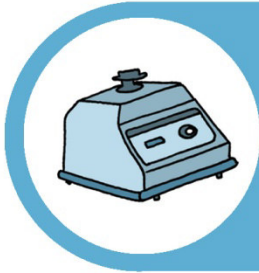
4. Rastreo genético basado en el uso del IPAC para la identificación de nuevas proteínas moduladoras de la señalización a través de la ruta CWI

Haciendo uso de la hipersensibilidad a estrés de pared provocada por el IPAC, hemos rastreado una subcolección de mutantes de delección en genes no esenciales buscando aquellos capaces de aliviar la inhibición del crecimiento que provoca el IPAC en presencia de los estímulos de la ruta CWI rojo Congo, zimoliasa y SDS. La reducción en la señalización a través de la ruta CWI se confirmó en estos mutantes mediante el análisis de la activación transcripcional de un gen reportero expresado de manera dependiente de la ruta. Entre los 19 mutantes identificados, destacan por su elevada reducción de la señalización *scp160Δ* y *bud27Δ*, afectados en proteínas relacionadas con la traducción o el metabolismo de RNA, y *sic1Δ*, mutado en un gen que codifica un regulador del ciclo celular. Estos resultados muestran el potencial de este tipo de aproximaciones de biología sintética en la búsqueda de moduladores de la señalización a través de las rutas de MAPKs.

Conclusiones

1. La mutación del glutámico 108 por glicina en el bolsillo de unión a ATP de Slt2 genera una versión de esta MAPK sensible a análogos de ATP, Slt2-as, funcional e inhibible por derivados de pirazol-pirimidina (PP1).

2. La inhibición de Slt2 en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* detiene su crecimiento, mostrando la mayoría de las células yemas pequeñas y deslocalización de la septina Cdc10.
3. La capacidad de Slt2-as para utilizar N⁶-(feniletil)-ATP-γ-S y tiofosforilar *in vitro* al factor de transcripción Rlm1, la MAPKK Mkk1, y la fosfatasa Msg5, indica su utilidad para la identificación de sustratos de esta MAPK.
4. Las proteínas Caf20, Rcn2 y Gga1 interaccionan con Slt2 y son tiofosforiladas por Slt2-as cuando son expresadas tanto en levadura como en *E. coli*, lo que sugiere su papel como sustratos de esta MAPK en condiciones fisiológicas.
5. La tiofosforilación por parte de Slt2-as de Caf20 ocurre en la treonina 102 y de Rcn2 en las serinas 152, 160 y 255.
6. Las mutaciones *gga2Δ* y *slt2Δ* presentan una interacción genética negativa en condiciones de estrés sobre la pared celular. La combinación de ambas mutaciones altera el tráfico de proteínas a través de la vía CPY.
7. La expresión del alelo *MKK1^{S386P}*, bajo el control del promotor del gen *MLP1*, configura un circuito de retroalimentación positiva de la ruta CWI (IPAC) que conduce, en condiciones de estimulación, a una amplificación continua de la señal que resulta letal. Las células con el IPAC son por tanto hipersensibles a agentes que activan la ruta CWI.
8. La utilización del circuito IPAC nos ha permitido identificar a la neomicina, el SDS, el EDTA, el LiCl, la difenilhidramina, el CoCl₂, el ZnCl₂ y el clotrimazol como activadores de la ruta CWI.
9. El tratamiento con neomicina desencadena una respuesta transcripcional relacionada con la biosíntesis de aminoácidos y, en menor medida, con una respuesta general a estrés, incluido el osmótico y el de pared celular.
10. En la activación de Slt2 por neomicina, además de los componentes de la ruta CWI a través de Mid2, participan Pkh1, Slm1 y Nbp2 así como los elementos de la ruta HOG Pbs2 y Hog1.
11. El clotrimazol provoca la aparición de dos formas de fosfo-Slt2 de diferente movilidad electroforética, de manera dependiente tanto de la integridad del sitio de activación como de la actividad catalítica de esta MAPK.
12. Slt2 es esencial para la especificidad de transmisión de la señal a través de la ruta CWI en respuesta a clotrimazol ya que, en ausencia de esta MAPK, este antifúngico provoca la fosforilación de Hog1.
13. El circuito IPAC ha permitido la identificación de Scp160, Bud27 y Sic1 como proteínas necesarias para una máxima respuesta transcripcional frente a condiciones activadoras de la ruta CWI.



SUMMARY

Title: Identification of activator compounds, modulator proteins and substrates of the MAPK Slt2 of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity pathway**Introduction**

A fundamental property of every cell is its ability to detect changes in environmental conditions and take appropriate action against them in order to adapt. In this process, transduction pathways mediated by mitogen activated protein kinases (MAPKs) are decisive. At the end of these routes, the signal is transmitted from one element to another by sequential phosphorylations, allowing amplification of signals initiated at the cell surface (Cargnello *et al.*, 2012). Once activated, the MAPK phosphorylates various elements including transcription factors (Chen and Thorner, 2007). Thus an adequate response is generated that involves gene expression modification and other changes in cell physiology. MAPKs regulate a variety of essential biological processes such as metabolism, cell morphology or cell cycle progression. Because many of the components of these pathways and mechanisms by which they operate are conserved, research in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has provided much of the knowledge we have today about MAPKs pathways in eukaryotic organisms. In *S. cerevisiae*, one of these routes is the cell wall integrity pathway (CWI) in which the MAPK Slt2 is activated by the MAPKKs Mkk1 and Mkk2. This pathway is activated by changes in the cell wall and leads to phosphorylation of the transcription factor Rlm1, which is responsible for most of the transcriptional response generated like a compensatory mechanism to safeguard the integrity of this essential structure (Levin, 2011). This route is of great importance, because the cell wall of fungi is a good drug target as it is not present in human cells.

Objectives

Our objectives are aimed at developing new tools for studying the CWI pathway and are the following:

- Generation and characterization of an analog-sensitive version of Slt2 that can be specifically inhibited by bulky kinase inhibitors (Slt2-as), in order to study the phenotype resulting from the inhibition of the CWI pathway in synthetic lethal mutants with *slt2Δ* and identify novel substrates of this MAPK.
- The use of a circuit of signal amplification of the cell wall Integrity pathway (IPAC) to identify new stimuli and modulatory components of this pathway.

Results y discussion

1. Study of cell morphology and structure of the septin ring in the *gas1Δ slt2-as* and *fks1Δ slt2-as* mutants after inhibition of Slt2-as

In order to generate an analog-sensitive version of Slt2, we mutated the gatekeeper E108 residue within the ATP-binding pocket of this MAPK to glycine. This version is sensitive to analogs of kinase inhibitors and allows us to study the effect of inhibiting Slt2 in various mutants that show synthetic lethality with the *slt2Δ* mutation. Among the mutants tested, only the double mutants *gas1Δ slt2-as* and *fks1Δ slt2-as* show a total dependence on Slt2 in the absence of stress. The *gas1Δ* and *fks1Δ* mutants are affected in the biosynthesis of cell wall glucan (Dijkgraaf *et al.*, 2002; Lagorce *et al.*, 2003). Inhibition of Slt2 in these mutants causes a large increase in the proportion of cells with small bud, suggesting a cell cycle arrest, probably in the S-G2 phase. It also alters the location of Cdc10, indicating that the integrity of the septin ring in this situation depends on the MAPK Slt2.

2. Screening for novel substrates of Slt2 by *in vitro* thiophosphorylation assays with Slt2-as

The modification of the active-site pocket also allows kinases-as to accept unnatural bulky ATP analogs, which have the Y-phosphate replaced by thiophosphate, and transfer this thiophospho group to their substrates. In this work we found that Slt2-as is able to use with high specificity N6-(phenethyl)-ATP-Y-S to thiophosphorylate *in vitro* known substrates of this MAPK, such as the transcription factor Rlm1 and the MAPKK Mkk1. With this methodology we proved that Slt2-as thiophosphorylates both the amino-terminal regulatory region and the carboxy-terminal catalytic region of the phosphatase Msg5. By using a quantitative SILAC-based phosphoproteomic approach, proteins containing phosphopeptides that display enhanced phosphorylation in S/TP MAPK phosphorylation sites upon CWI pathway stimulation were previously identified as putative Slt2 targets (Mascaraque *et al.*, 2013). We show that out of 15, Slt2-as thiophosphorylates Caf20, Rcn2 and Gga1. These proteins are able to interact with Slt2, supporting the idea that they are physiological substrates. Thiophosphorylation of Caf20, a yeast translation repressor protein (Altmann *et al.*, 1997), occurs at threonine 102 and provides new clues to investigate how MAPKs modulate translation in response to distinct types of stress in yeast. Moreover, Rcn2, along with its paralog Rcn1, regulate the calcineurin pathway (Mehta *et al.*, 2009). Slt2 thiophosphorylates both proteins. Our results suggest that these regulators could serve as a link between the CWI pathway and Ca²⁺ signaling in *S. cerevisiae*. In fact, it was already described that Slt2 regulates the calcineurin pathway in response to endoplasmic reticulum

stress through unknown targets (Bonilla and Cunningham, 2003). Finally, Gga1 is an adapter protein associated to the Golgi apparatus and involved in Golgi to vacuole trafficking (Miller *et al.*, 2003). Deletion of *GGA2*, a paralogue of *GGA1*, increases sensitivity of a *slt2Δ* mutant to cell wall stress. These results suggest that proper regulation of traffic to the vacuole is necessary for cell wall integrity. In addition, we observed that deletion of *SLT2* causes an abnormal carboxypeptidase Y (CPY) release in a *gga2Δ* mutant, which indicates that Slt2 might participate in traffic through the CPY pathway through Gga1 phosphorylation.

3. Screening for new activators of the CWI pathway by using a genetic signal amplification circuit.

We have developed a positive feedback genetic circuit of the CWI pathway named IPAC (*Circuit Amplification Pathway Integrity*), composed of the hyperactive allele of one of the MAPKK of the CWI pathway, *Mkk1^{S386P}* (Watanabe *et al.*, 1995), under the control of the promoter of *MLP1*, one of the genes whose induction is stronger in activation conditions of this route (Arias *et al.*, 2011). After stimulation, this circuit produces a continuous amplification of the signal transmitted by the pathway, which is lethal and makes cells carrying this circuit hypersensitive to cell wall damage. Based on such hypersensitivity, we screened a series of compounds and identified neomycin, clotrimazole, SDS, EDTA, lithium chloride, zinc chloride, cobalt chloride and diphenhydramine as potential activators of this route, which was confirmed by checking that all these compounds increased the phosphorylation of Slt2. Clotrimazole is an antifungal agent that inhibits lanosterol-14-demethylase, an enzyme required for ergosterol biosynthesis of the fungal cell membrane (Helmick *et al.*, 2005). In this work, we detected that clotrimazole causes the appearance of a band of lower electrophoretic mobility than Slt2, which is recognized by antibodies against Slt2 and its phosphorylated form. The appearance of this double band is dependent on activation of Slt2 and its own catalytic activity. However, it is not caused by autophosphorylation. Furthermore, clotrimazole, in the absence of Slt2, activates the high osmolarity pathway (HOG). The study of this phenomenon can be very useful for understanding the mechanisms that ensure the specificity of signaling through the CWI pathway. Neomycin is an aminoglycoside which inhibits protein synthesis by blocking the small subunit of ribosomes (Tuite and McLaughlin, 1984). Here we show that it causes the activation of the CWI pathway in a manner dependent on elements of this route and the route HOG, as well as on the protein kinase Pkh1 and Slm1, protein that have binding domains of PtdIns-4,5P₂, and the Nbp2 adaptor protein. It is interesting to note that no other assayed protein synthesis inhibitor was capable of activating the CWI pathway, so neomycin should affect a cellular structure or function

specifically. In response to neomycin, besides amino acid biosynthesis genes, genes involved in stress response, cell wall biosynthesis and lipid metabolism are also differentially expressed. Because this aminoglycoside binds with high affinity to PtdIns-4,5P₂ of the mammalian cell membrane (Schacht, 1976; Lodhi *et al.*, 1979), activation of the CWI pathway could be due to an alteration in the availability of phosphoinositides in the plasma membrane, or an indirect consequence of the alteration of a function regulated by PtdIns-4,5P₂ such as cellular endocytosis. In fact, neomycin accelerates the process of entry into the vacuole of the vital dye FM4-64.

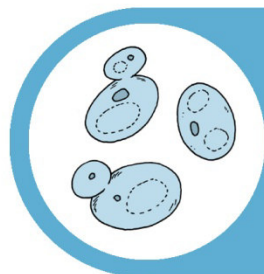
4. Genetic screening based on the use of the IPAC circuit for identifying new modulators of the signaling of CWI pathway

The hypersensitivity to cell wall stress caused by the IPAC allowed us to screen a subcollection of deletion mutants in non-essential genes to identify those capable of alleviating the growth inhibition caused by the IPAC in the presence of Congo red, zymolyase and SDS, as activator compounds of the CWI pathway. The reduction in signaling through the CWI route in these mutants was confirmed by analyzing the transcriptional activation of a reporter gene of this pathway. Out of the 19 mutants identified, *scp160Δ* and *bud27Δ*, affected in translation-related proteins or RNA metabolism, and *sic1Δ*, mutated in a gene encoding a cell cycle regulator, display the stronger decrease in signaling through the CWI pathway. These results show the potential of this type of synthetic biology approaches in the search for modulators of the signaling through the MAPK pathways.

Conclusions

1. Mutation of the gatekeeper E108 residue to glycine at the ATP-binding pocket of the MAPK Slt2 generates an analog-sensitive mutant version, Slt2-as, functional and able to accommodate derivatives of pyrazol-pyrimidine (PP1), which inhibits its catalytic activity.
2. Inhibition of Slt2 in mutant *gas1Δ slt2-as* and *fks1Δ slt2-as* causes growth arrest, most of the cells showing small buds and delocalization of septin Cdc10.
3. The ability of Slt2-as to use N6-(phenethyl)-ATP-Y-S and thiophosphorylate *in vitro* the transcription factor Rlm1, the MAPKK Mkk1, and the phosphatase Msg5, indicates its usefulness in identifying novel substrates of this MAPK.
4. Caf20, Rcn2 and Gga1 proteins interact with Slt2 and are thiophosphorylated by Slt2-as when expressed in both yeast and *E. coli*, suggesting its role as substrates of this MAPK under physiological conditions.

5. Thiophosphorylation of Caf20 by Slt2-as occurs in threonine 102 and in serines 152, 160 and 255 of Rcn2.
6. Mutations *gga2Δ* and *slt2Δ* show negative genetic interaction under conditions of cell wall stress. The combination of both mutations alters protein trafficking through the CPY route.
7. Expression of allele *MKK1^{S386P}*, under the control of *MLP1* promoter, constitutes a positive feedback circuit of the CWI pathway (IPAC) that, under stimulation conditions, leads to continuous signal amplification, which is lethal. Cells with IPAC are therefore hypersensitive to agents that activate the CWI pathway.
8. The use of IPAC circuit allowed us to identifying neomycin, SDS, EDTA, LiCl, diphenhydramine, CoCl₂, ZnCl₂ and clotrimazole as activators of the CWI pathway.
9. Neomycin treatment triggers a transcriptional response related to amino acid biosynthesis and to a lesser extent, to an overall response to stress, including osmotic and cell wall stress.
10. In addition to the CWI pathway components, through Mid2, Pkh1, Slm1, Nbp2 and elements of HOG pathway as Pbs2 and Hog1 participate in the activation of Slt2 by neomycin.
11. Clotrimazole causes the appearance of two forms of phospho-Slt2 of different electrophoretic mobility, in a manner dependent on the integrity of the activation site and the catalytic activity of this MAPK.
12. Slt2 is essential for the specificity of signal transmission through the CWI pathway in response to clotrimazole since, in the absence of this MAPK, this antifungal compound leads to Hog1 phosphorylation.
13. The IPAC circuit allowed us to identify Scp160, Bud27 and Sic1 as proteins necessary for maximum transcriptional response against stress conditions that trigger the CWI pathway.



INTRODUCCIÓN

1. LA PARED CELULAR DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un organismo eucariótico unicelular de fácil manipulación, con rápida velocidad de división y crecimiento, fácil de cultivar y con unos mecanismos de regulación celular bastantes semejantes a los de los organismos pluricelulares. Debido al alto grado de conservación de las rutas bioquímicas fundamentales y a que la maquinaria molecular de muchos procesos celulares son similares a los de las plantas y mamíferos, la levadura ha sido utilizada como modelo de célula eucariota para estudiar procesos biológicos y realizar análisis de genómica funcional (Mager y Winderickx, 2005). Sin embargo, las levaduras presentan una pared celular que es específica de estos organismos ya que no está presente en células humanas. La pared celular de los hongos es una estructura rígida y a la vez dinámica, con gran plasticidad, que da forma a la célula, es necesaria para la formación de las yemas y la división celular, es el lugar de interacción con el medio externo, controla la permeabilidad celular y protege a la célula frente a las diversas condiciones adversas del medio en el que viven, como cambios osmóticos y estreses mecánicos. Por ello es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis (Orlean, 2012). Además, al no estar presente en células de mamíferos es una buena diana farmacológica. De hecho, en los últimos años se han descubierto varios antifúngicos que tienen como diana la síntesis de β -1,3-glucano, componente fundamental de la pared. Entre estos compuestos se encuentra la caspofungina, anidulafungina y micafungina, pertenecientes a la familia de las equinocandinas, que son inhibidores de la β -1,3-glucan sintasa (Sucher *et al.*, 2009; Héctor y Bierer, 2011).

La pared celular de *S. cerevisiae* tiene un grosor de entre 0.1-0.2 μ m, representa el 15-30% del peso seco de la célula (Fleet, 1985; Orlean, 2012) y está constituida principalmente por polisacáridos (~ 85%), proteínas (~ 15%), lípidos y sales minerales (Nguyen *et al.*, 1998). Existen tres tipos de polisacáridos en la pared celular: el β -1,3 glucano y el β -1,6 glucano, formados por polímeros con unidades de glucosa unidos mediante enlaces β -1,3 o β -1,6 respectivamente (Cabib *et al.*, 1988; Ruiz-Herrera, 1991) y la quitina formada por polímeros de unidades de N-acetil-glucosamina (NAG), unidas por medio de enlaces β -1,4 (Minke y Blackwell, 1978). Además existen manosas unidas covalentemente a las proteínas formando las manoproteínas (Cappellaro *et al.*, 1994; Lipke y Ovalle, 1998) (Figura 1).

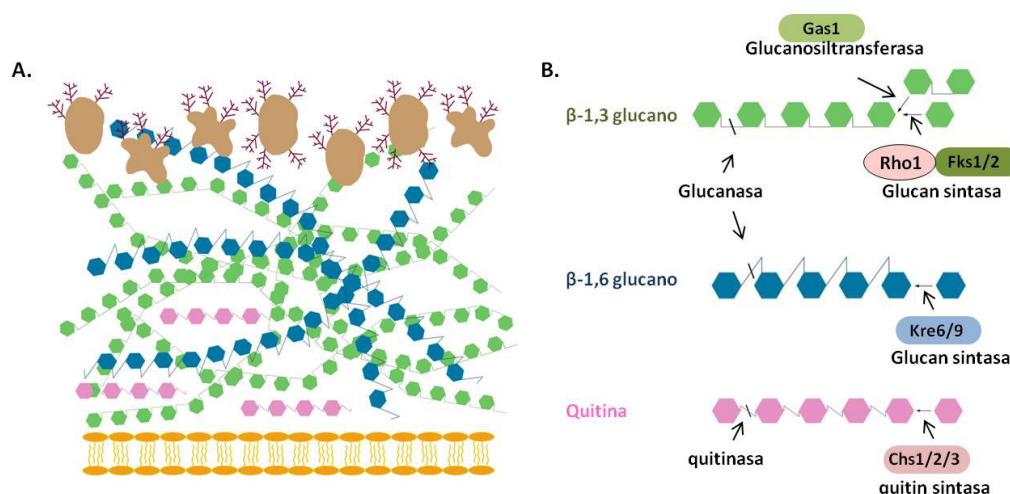


Figura 1: Pared celular. A. Esquema donde se muestran los principales polisacáridos que forman la pared celular. B. Principales enzimas responsables de la síntesis y degradación de los componentes de la pared.

La organización de esta estructura es laminar con una capa externa constituida principalmente por manoproteínas y una capa interna compuesta por los polímeros de glucano y quitina que proporciona la fuerza mecánica de la pared celular (Orlean, 2012). Se ha propuesto que en la pared celular, las cadenas de β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6 forman una matriz a la que se unen covalentemente la quitina y las manoproteínas, pudiendo unirse estas últimas al β -1,3 glucano directamente o indirectamente a través del β -1,6-glucano (Kollar *et al.*, 1997) (Figura 2). La síntesis de glucano y quitina tiene lugar por la acción de glucan y quitin sintasas generalmente situadas en la membrana plasmática. A continuación, enzimas ensambladoras como las glucanosiltransferasas o las transglucosilasas, unen los componentes nuevos a los ya existentes en la pared (Goldman *et al.*, 1995; Popolo y Vai, 1999; Rodríguez-Peña *et al.*, 2000). De este modo se generan complejos bien organizados por medio de uniones glucosídicas entre los diferentes polisacáridos y manoproteínas formándose así una estructura muy estable. Por último, las glucanasas, quitinasas y mananasas desarrollan las principales actividades líticas (Cabib y Arroyo, 2013) (Figura 1).

Este complejo macromolecular es una estructura dinámica, que puede variar en composición y grosor para adaptarse a los procesos morfogénéticos (Cid *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 2000; Klis *et al.*, 2006) o a situaciones de estrés que alteran esta estructura (temperatura, composición del medio, pH externo, niveles de oxigenación, etc), activándose así una respuesta celular conocida como “mecanismo compensatorio” (Popolo *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 2001). Este mecanismo está principalmente regulado a través de la ruta de integridad celular (CWI) e incluye un incremento en el contenido de quitina en la pared lateral de la célula madre e hija (Smits *et*

al., 1999), cambios en la asociación entre diferentes polímeros de la pared (Kapteyn *et al.*, 1997), un incremento de distintas proteínas de la pared celular (Jung y Levin, 1999; Kapteyn *et al.*, 1999; de Nobel *et al.*, 2000) una redistribución transitoria del complejo β -1,3 glucan sintasa en toda la superficie celular (Delley y Hall, 1999) y una respuesta transcripcional estímulo-específica que incluye, entre otros genes, un grupo numeroso relacionado con la biogénesis de la pared celular (Lagorce *et al.*, 2003; García *et al.*, 2004).

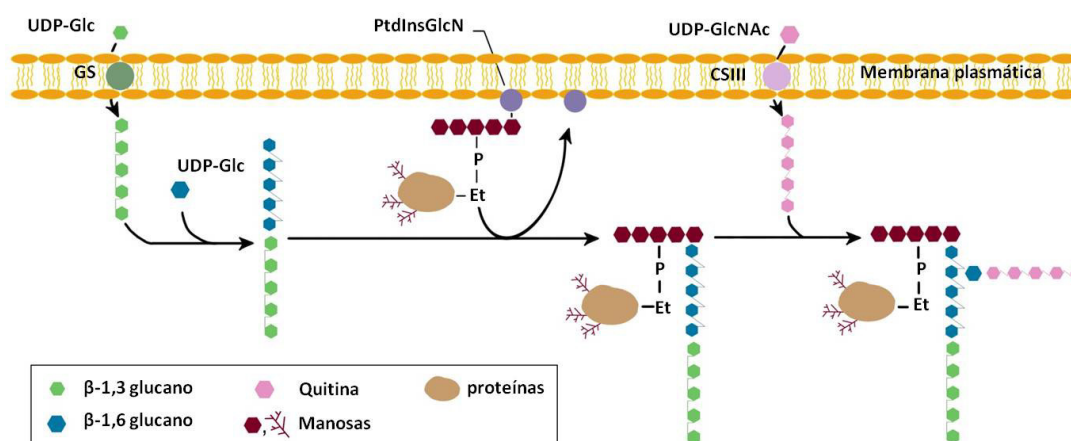


Figura 2: Pasos en la síntesis de la pared: se sintetiza el β -1,3 glucano a partir de UDP-glucosa (UDP-Glc) por acción de la β -1,3 glucan sintasa (GS); se añade el β -1,6 glucano; las manoproteínas, junto con glicosilfosfatidilinositol, se une al β -1,6 glucano; y por último, la quitina se sintetiza a partir de UDP-N-acetilglucosamina (GlcNAc-UDP) por acción de la quitin sintasa III (CSIII) y se transfiere al β -1,6 glucano. Et: etanolamina; P: grupo fosfato; PtdInsGlcN: fosfatidilinositol-glucosamina (adaptada de Cabib y Arroyo, 2013).

1.1. β -1,3 glucano

De todos los polisacáridos, el componente estructural más abundante de la pared celular es el β -1,3 glucano, constituyendo así el 50-60% del peso seco de la pared (Klis *et al.*, 2006).

Las enzimas encargadas de la síntesis de β -1,3 glucano son las β -1,3 glucan sintasas (GS) que catalizan la transferencia de un residuo glicosil procedente del precursor citoplasmático UDP-glucosa a la cadena de β -1,3 glucano en crecimiento (Cabib y Kang, 1987)(Figura 1 y 2). La actividad β -1,3 glucan sintasa se localiza en la membrana plasmática, en sitios de crecimiento polarizado (Qadota *et al.*, 1996) coincidiendo con los parches de actina (Qadota *et al.*, 1996; Utsugi *et al.*, 2002) y está determinada por un complejo enzimático compuesto por una subunidad reguladora codificada por el gen *RHO1* (Mazur y Baginsky, 1996; Klis *et al.*, 2006;

Lesage y Bussey, 2006) y una subunidad catalítica codificada por dos genes que presentan alta homología entre sí, denominados *FKS1* y *FKS2* (Figura 1).

Los mutantes *fks1Δ* presentan una reducción en los niveles de β -1,3 glucano y un aumento en los niveles de quitina y manano, como consecuencia del “mecanismo compensatorio” (Dallies *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2000; Lesage *et al.*, 2004), además de fenotipos de sensibilidad a las equinocandinas y al blanco de Calcoflúor (CFW), compuesto que se une a la quitina impidiendo su interacción con los demás componentes. Recientemente Fks1 ha sido implicada en endocitosis de manera independiente de su papel en la remodelación de la pared (Okada *et al.*, 2010). Por otro lado, los mutantes *fks2Δ* presentan defectos en esporulación pero no en crecimiento vegetativo. Sin embargo, ambas proteínas presentan un papel parcialmente redundante ya que el doble mutante *fks1Δ fks2Δ* es inviable (Inoue *et al.*, 1995).

FKS1 y *FKS2* presentan patrones de expresión distintos. *FKS1* se expresa durante el crecimiento vegetativo de manera dependiente del factor de transcripción Swi4, aumentando su transcripción al final de la fase G1 y comienzo de la fase S (Mazur *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1995). Además se expresa en condiciones de hiperactivación de la ruta CWI de forma dependiente del factor de transcripción Rlm1 (Jung y Levin, 1999). Sin embargo, la expresión de *FKS2* se ve favorecida en condiciones de baja concentración de glucosa en el medio regulada por la proteína-quinasa Snf1, o en presencia de galactosa, glicerol o acetato (Zhao *et al.*, 1998). También existe una activación de *FKS2* regulada por la ruta CWI, pero en este caso independiente de Rlm1, y por la ruta de la calcineurina, ante una gran variedad de estímulos ambientales como son: la presencia de calcio en el medio, el tratamiento con factor α , un aumento de la temperatura a 39°C o el tratamiento con agentes que causan daños en la pared celular (Levin, 2011). Entre estos agentes se encuentra la caspofungina que, como ya hemos mencionado anteriormente, inhibe la síntesis de β -1,3 glucano (Reinoso-Martín *et al.*, 2003), el rojo Congo (RC), que se une a la quitina interfiriendo con el correcto ensamblaje de la pared celular (Ketela *et al.*, 1999, García *et al.*, 2004) o la zimoliasa (ZI), una mezcla enzimática que degrada la pared principalmente por su actividad β -1,3-glucanasa (Bermejo *et al.*, 2008).

Una vez que el β -1,3 glucano ha sido sintetizado de manera lineal y transportado al espacio periplásmico, este polímero debe madurar e integrarse en la pared celular por acción de transglicosilasas o glucanosiltransferasas, proteínas con actividad catalítica implicadas en la

elongación y remodelación de los polisacáridos de la pared (Ragni *et al.*, 2007; Rolli *et al.*, 2011). La familia de proteínas Gas, que comprende cinco proteínas diferentes: Gas1, Gas2, Gas3, Gas4 y Gas5, es la mejor caracterizada por su implicación en la remodelación de la pared. Estas proteínas intervienen en la elongación del β -1,3 glucano mediante la adición de nuevas cadenas de este polímero a las ya existentes a través de la creación de enlaces entre el extremo reductor de una cadena de β -1,3 glucano donadora y el extremo no reductor de una molécula de β -1,3 glucano aceptora (Mouyna *et al.*, 2000; Carotti *et al.*, 2004; Mazan *et al.*, 2011) (Figura 1). Entre ellas, Gas1 juega quizás el papel más importante en la biogénesis de la pared celular, ya que presenta interacciones sintético letales con otras proteínas que participan en este proceso (Tomishige *et al.*, 2003). Gas1 se localiza en la capa exterior de la pared celular mediante su dominio GPI (resto GPI unido a β -1,6 glucano) (Popolo *et al.*, 1993; Popolo y Vai, 1999) y es una proteína altamente O-glicosilada y N-glicosilada. La pérdida de Gas1 genera defectos morfológicos graves, una disminución en el entrecruzamiento de los glucanos, un aumento en los niveles de quitina, una alta sensibilidad a compuestos como el CFW o la caspofungina (Ram *et al.*, 1995; Ram y Klis, 2006) y dispara el “mecanismo compensatorio” de la célula mediado por la ruta CWI. Por otro lado, las proteínas Crh1 y Crh2 son transglicosilasas que participan en la unión de la quitina al β -1,3 y β -1,6 glucano (Rodríguez-Peña *et al.*, 2000; Cabib *et al.*, 2008) y Bgl2, una β -1,3 glucosiltransferasa, introduce enlaces β -1,6 en las cadenas de β -1,3 glucano en el proceso de ramificación de este polímero (Goldman *et al.*, 1995; Cabib y Arroyo, 2013).

1.2. β -1,6 glucano

Este polímero representa el 10% del peso seco de la pared celular (Manners *et al.*, 1973) y es responsable de su estabilización, ya que juega un papel central en la interconexión de todos los componentes al ensamblarse al β -1,3 glucano, la quitina y las manoproteínas (Kollar *et al.*, 1997) (Figura 1 y 2).

Más de 20 genes han sido identificados por su posible implicación en la síntesis de β -1,6-glucano en *S. cerevisiae* (Shahinian y Bussey, 2000; Lesage y Bussey, 2006), incluyendo a la familia de genes llamados *KRE* (*Killer toxin resistant*) (Boone *et al.*, 1990), identificada por su resistencia a la toxina *Killer* K1 (Hutchins y Bussey, 1983; Page *et al.*, 2003) y compuesta por 14 miembros y sus homólogos, *SKN1* y *KNH1* (Lussier *et al.*, 1997; Nagahashi *et al.*, 1998). Adicionalmente, se han identificado genes denominados *CWH* (*Calcofluor White Hypersensitive*) relacionados con la síntesis del β -1,6 glucano mediante el escrutinio de mutantes sensibles al blanco de Calcoflúor (Orlean, 2012). Entre todos estos genes, *KRE5*, *KRE6* y *KRE9* codifican

proteínas que parecen estar implicadas en la catálisis de la síntesis del β -1,6-glucano, ya que su delección provoca una disminución de los niveles de este polímero en la pared celular, aunque no exista evidencia bioquímica de que alguna de estas proteínas constituya la subunidad catalítica de la β -1,6-glucan sintasa (Aimanianda *et al.*, 2009). En todo caso, Kre9 parece ser el candidato más probable para estar implicado directamente en la síntesis del β -1,6-glucano ya que se localiza en la pared celular y la doble delección de *KRE9* y su homólogo *KNH1*, es letal (Dijkgraaf *et al.*, 1996; Nagahashi *et al.*, 1998). Kre6 se localiza en la membrana del aparato de Golgi y muestra una expresión dependiente del ciclo celular con un pico de máxima transcripción durante las etapas G1/S y M (Igual *et al.*, 1996; Spellman *et al.*, 1998) al igual que su homólogo Skn1 (Boone *et al.*, 1990; Roemer *et al.*, 1993). Esta proteína presenta homología con las glucosilhidrolasas o transglicosilasas (Montijn *et al.*, 1999), lo que indica que podría participar en la síntesis o procesamiento del β -1,6 glucano. Además interacciona genéticamente con miembros de la ruta CWI, lo que sugiere una posible regulación por parte de esta ruta sobre la síntesis de β -1,6 glucano (Roemer *et al.*, 1994).

1.3. Quitina

La quitina solo representa el 1-2% del peso seco de la pared celular aunque tiene un papel esencial en la morfogénesis celular por su contribución en la formación del septo (Cabib *et al.*, 2001; Cabib, 2004). Es un polímero lineal de 100 o 200 residuos de NAG unidos mediante enlaces β -1,4 (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1999) que forma fibras (Carlstrom, 1957; Minke y Blackwell, 1978) (Figura 1). La quitina de la pared, que puede estar libre (43% de la quitina total) o unida al β -1,3 glucano (41%) o al β -1,6 glucano (16%), se encuentra en cuatro localizaciones diferentes: en la base de la yema en forma de anillo; en el septo primario (SP) entre la célula madre y la célula hija; en las cicatrices que presenta la célula madre después de la división celular y uniformemente repartida por la pared lateral (Cabib *et al.*, 2001; Orlean, 2012).

La síntesis de quitina en *S. cerevisiae* es un proceso asociado al ciclo celular (Roberts *et al.*, 1983), controlado espacial y temporalmente (Orlean, 2012). El depósito de quitina comienza en el momento de la gemación, cuando en la base de la yema se forma el anillo de quitina, que quedará intacto durante el crecimiento de la misma y permanecerá en el lado de la madre tras la separación celular. Al final de la mitosis se forma el septo primario de quitina que se deposita en el cuello de manera centrípeta entre la madre y la hija, al igual que el septo secundario formado por quitina, β -1,3 glucano, β -1,6 glucano y manoproteínas unidas covalentemente (Rolli *et al.*, 2009). Tanto el anillo como el septo formarán parte de la cicatriz de la célula madre tras la

división (Cabib y Bowers, 1971) y la célula hija presentará una pequeña cantidad de quitina en la pared lateral depositada tras la citoquinesis (Shaw *et al.*, 1991).

Las proteínas responsables de la síntesis de quitina son las quitin sintasas, y la reacción enzimática consiste en la adición de un residuo de UDP-N-acetil-glucosamina formado en el citosol, a la cadena de quitina en formación (Cabib y Kang, 1987; Cabib y Arroyo, 2013) (Figura 1 y 2). *S. cerevisiae* tiene tres actividades enzimáticas implicadas en este proceso: CSI (*Chitin Synthase I*), CSII y CSIII que son codificadas por los genes *CHS1*, *CHS2* y *CHS3*, respectivamente (Valdivieso *et al.*, 1991). Estas enzimas se encuentran en la membrana plasmática de forma activa y requieren ser secretadas para su correcta localización y activación (Orlean, 2012).

La actividad CSI, al igual que CSIII, se localiza en la membrana plasmática y en los quitosomas, vesículas intracelulares que a través de la ruta de secreción regulan la síntesis de quitina movilizándolo a las quitin sintasas a la membrana plasmática (Chuang y Schekman, 1996; Valdivia y Schekman, 2003). Se cree que Chs1 está implicada en la reparación de la pared celular tras la citoquinesis (Cabib *et al.*, 1992). Chs2 es responsable de la actividad CSII y media la síntesis de la quitina del septo primario durante la citoquinesis, siendo *CHS2* esencial para el crecimiento de la levadura ya que en su ausencia se genera un septo primario anormal y la división celular queda interrumpida (Silverman *et al.*, 1988). Su correcta localización en el cuello depende del correcto ensamblaje de las septinas y concuerda con la salida de la mitosis y la reorganización del collar de septinas en dos anillos (Orlean, 2012).

El gen que codifica la enzima Chs3 se clonó por complementación del fenotipo de un mutante resistente a CFW (Valdivieso *et al.*, 1991; Orlean, 2012) y es responsable de la mayoría de la síntesis de la quitina presente en la célula, ya que sintetiza la quitina durante la emergencia de la yema, el crecimiento celular, el apareamiento y la formación de la espora (Bulawa, 1993). Chs3 es transportada desde la red de *trans*-Golgi (TGN) a endosomas por medio de las proteínas de unión a fosfoinosítidos Ent3 y Ent5 y los adaptadores de clatrina GGAs y AP-1 (Copic *et al.*, 2007). A lo largo del ciclo celular los niveles de Chs3 permanecen constantes aunque esta proteína sufre cambios en su localización siendo reclutada al sitio de gemación al inicio de la fase G1 y endocitada al final del ciclo celular. Durante la citoquinesis esta proteína vuelve a redistribuirse en el cuello de la madre (Chuang y Schekman, 1996). Los niveles de quitina están relacionados con la cantidad de Chs3 en la membrana plasmática; así, los mutantes *fks1Δ* o *gas1Δ*, que presentan una pared celular anormal, experimentan un incremento en la síntesis de

quitina como resultado de la activación de la ruta CWI y un aumento de Chs3 en la membrana (García-Rodríguez *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2009). Por lo tanto esto, junto con el hecho de que el doble mutante *chs2Δ chs3Δ* es inviable (Bulawa y Osmond, 1990), demuestra que la quitina, a pesar de ser el componente minoritario de la pared celular, es indispensable para la viabilidad celular.

1.4. Manoproteínas

Como ya hemos mencionado anteriormente, la pared celular también está constituida por manoproteínas que representan un 35-40% del peso seco y que se denominan CWP (*Cell Wall Proteins*) (Figura 1). Estas glicoproteínas son proteínas a las cuales, por medio de procesos de O- y/o N-glicosilación, se incorporan cadenas de azúcares cuando son transportadas al exterior celular a través de la ruta de secreción (Loibl y Strahl, 2013). En el caso de algunas proteínas se une además una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en su extremo C-terminal (Orlean, 2012) (Figura 2). Según cómo se unan a la pared existen dos grandes grupos de proteínas: las denominadas GPI-CWPs, que presentan un remanente del anclaje GPI y que generalmente están unidas al β -1,6 glucano, y las ASL-CWPs (*Alkali-sensitive linkaje-CWPs*) entre las que se incluye la familia PIR (proteínas con repeticiones internas) (Kapteyn *et al.*, 1999), que están unidas directamente al β -1,3 glucano por medio de enlaces covalentes. Además, existe una fracción de proteínas que se unen no covalentemente a componentes estructurales de la pared como la endoglucanasa Bgl2, o mediante puentes disulfuro a otras proteínas como la subunidad Aga2 de una α -aglutinina en células MATa (Klebl y Tanner, 1989; Cappellaro *et al.*, 1994). Estas glicoproteínas tienen diversas funciones participando en el mantenimiento de la forma celular, interviniendo en los procesos de adhesión, protegiendo a la célula de sustancias extrañas, determinando la porosidad de la pared, participando en la absorción de moléculas, transmitiendo señales al citoplasma y sintetizando y remodelando los componentes de la pared (Orlean, 2012).

2. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKs EN *Saccharomyces cerevisiae*

Una propiedad fundamental de toda célula viva es su capacidad de detectar cambios en las condiciones ambientales de crecimiento o la presencia de diferentes estímulos, y actuar adecuadamente frente a ellos para así adaptarse. En este proceso son determinantes las rutas de transducción de señales. Gracias a ellas las células detectan, amplifican e integran las señales

procedentes del exterior, para generar una respuesta apropiada por medio de modificaciones en su patrón de expresión genética, o en su actividad celular, con el fin de sobrevivir.

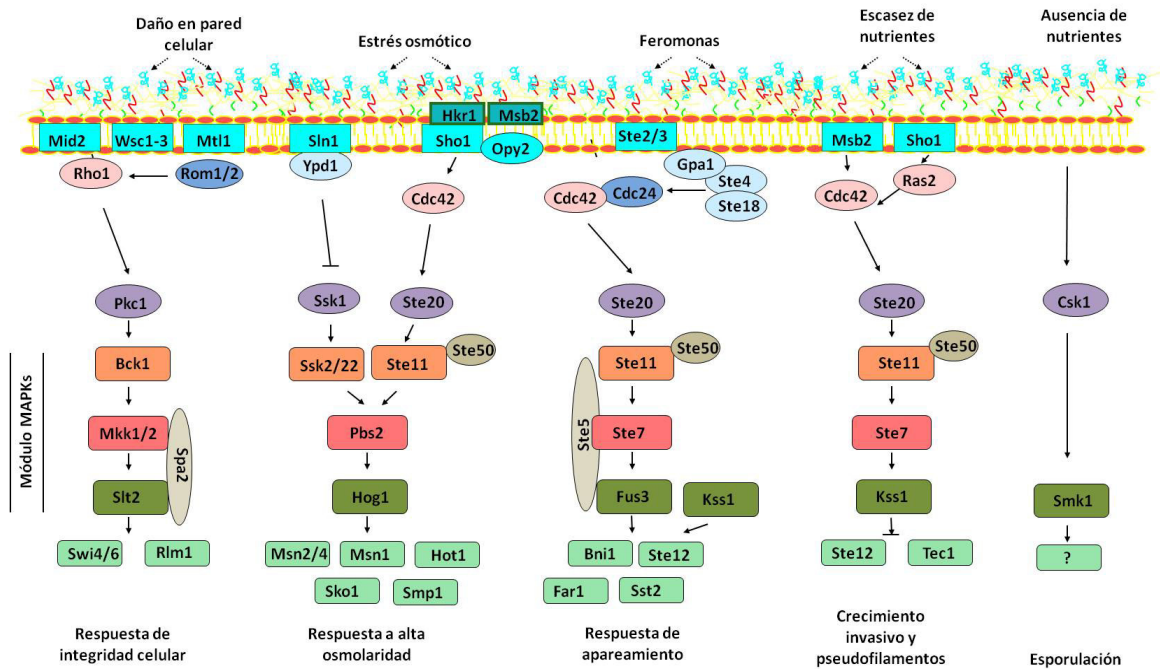


Figura 3: Representación esquemática de las rutas de MAPK de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las principales rutas de transducción de señales en células eucarióticas son las mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que constan de un módulo conservado de proteínas quinasas, donde la señal se transmite de un elemento a otro por fosforilaciones secuenciales, permitiendo así la amplificación de las señales iniciadas en la superficie celular (Cargnello *et al.*, 2012). En este módulo, la fosforilación y activación del primer componente de esta cascada, la MAPKKK, conduce a la fosforilación del siguiente, la MAPKK, que a su vez fosforila y activa a la MAPK (Cooper, 1994; Marshall, 1994; Cobb y Goldsmith, 1995). Las MAPKKKs contienen un dominio Ser/Thr proteína quinasa C-terminal. En condiciones de activación, la MAPKKK fosforila dos residuos de serina o treonina de posiciones conservadas en el dominio de activación de su MAPKK diana, la cual es una proteína quinasa de especificidad dual (Ser/Thr y Tyr). La MAPKK activada fosforila ambos residuos de treonina y tirosina de un motivo -Thr-X-Tyr- conservado en el dominio de activación de su diana, la MAPK, produciéndose la activación de ésta, debido a cambios conformacionales. Una vez activada, la MAPK fosforila a elementos como factores de transcripción así como a otras proteínas en residuos de serina y treonina en motivos -Ser/Thr-Pro- (Chen y Thorner, 2007) generando una respuesta adecuada

que puede implicar una modificación de la expresión génica, una regulación del metabolismo, cambios en la morfología celular o en la progresión del ciclo celular.

La inducción de estas rutas es transitoria, y su retorno a condiciones de activación basal depende fundamentalmente de proteínas fosfatasa que reconocen la forma fosforilada de la MAPK y revierten la activación una vez que la célula ha respondido al estímulo extracelular o se ha adaptado a las nuevas condiciones (Martín *et al.*, 2005). Además, la especificidad de cada ruta se regula a varios niveles por interacciones específicas entre los componentes de la misma ruta, el reclutamiento de las quinasas que operan en la ruta mediante proteínas de andamiaje (*scaffold*) o por otros mecanismos a veces modulados por las propias MAPKs mediante retrofosforilación (Molina *et al.*, 2010). Sin embargo, para responder a algunos estímulos, puede ser necesaria la comunicación entre diferentes vías (Buehrer y Errede, 1997; Fuchs y Mylonakis, 2009; García *et al.*, 2009).

Las MAPKs regulan una gran variedad de procesos biológicos esenciales que en eucariotas superiores van desde la proliferación y la diferenciación celular a la apoptosis (Cowan y Storey, 2003; Cargnello y Roux, 2011). En mamíferos, su alteración está en muchos casos relacionada con patologías humanas como el cáncer (Haagenson y Wu, 2010; Zheng *et al.*, 2011). Debido a que muchos de los componentes de estas rutas y mecanismos por los cuales operan están conservados evolutivamente en todo el reino eucariota, la investigación realizada en la levadura *S. cerevisiae* ha proporcionado gran parte del conocimiento que se tiene actualmente de las rutas de MAPKs. En esta levadura se conocen cinco rutas de MAPKs (Figura 3): la ruta de integridad celular regulada por la MAPK Slt2, la ruta de respuesta a alta osmolaridad dependiente de Hog1, la ruta de respuesta a feromonas donde participan las MAPKs Fus3 y Kss1, la ruta de crecimiento invasivo y pseudofilamentoso controlada por Kss1 (aunque también Kss1 regula la integridad celular en respuesta a defectos en la glicosilación de proteínas), y por último, la ruta implicada en la esporulación en la que actúa Smk1 (Hunter y Plowman, 1997; Qi y Elion, 2005). Repasaremos con más detalle las dos primeras.

2.1. Ruta de respuesta a alta osmolaridad/glicerol (HOG)

La ruta HOG (*high osmolarity glicerol*) responde a un aumento en la concentración de soluto disuelto en el medio, lo que altera la homeostasis celular y por consiguiente, la presión de turgencia y la viabilidad (Hohmann, 2009). En esta ruta, en la que interviene la MAPK Hog1, se desencadena un mecanismo compensatorio para recuperar el balance osmótico, cuya última

consecuencia es un aumento en la síntesis de glicerol intracelular. El estrés osmótico no sólo induce la acumulación de glicerol en la célula, sino que además provoca una alteración en la fisiología celular causando la reorganización del citoesqueleto, cambios en la dinámica de la pared celular, un gran cambio en la expresión génica (Hohmann, 2002) y parada del ciclo celular inhibiendo la expresión de ciclinas en G1 (Belli *et al.*, 2001; González-Novo *et al.*, 2015). Asimismo se han descrito otras situaciones que inducen la activación de la MAPK Hog1, como el estrés oxidativo (Bilsly *et al.*, 2004), la presencia de arsenito (Sotelo y Rodríguez-Gabriel, 2006; Thorsen *et al.*, 2006), de ácido acético (Mollapour y Piper, 2006), de peróxido de hidrógeno (Staleva *et al.*, 2004) o de cadmio (Jiang *et al.*, 2014). También tras choque térmico (Winkler *et al.*, 2002) o bajas temperaturas (Hayashi y Maeda, 2006; Panadero *et al.*, 2006), presencia del antifúngico nistatina (Reiser *et al.*, 2003), condiciones de hipoxia (Hickman *et al.*, 2011), pH ácido (Kapteyn *et al.*, 2001), la inhibición de la síntesis de esfingolípidos (Tanigawa *et al.*, 2012) o tras el daño en la pared producido por zimoliasa (Bermejo *et al.*, 2008).

La activación de Hog1 puede darse por dos posibles ramas que se diferencian no sólo en sus componentes, sino también en el modo en que responden a condiciones de hiperosmolaridad. Ambas vías confluyen en la MAPKK Pbs2 y la MAPK Hog1, homóloga a la MAPK p38 de mamíferos (Hohmann, 2002; O'Rourke y Herskowitz, 2002) (Figura 4).

En una de las ramas opera la proteína transmembrana Sln1, que es más sensible y rápida en responder a cambios osmóticos, y además permite una activación total en ausencia de la otra vía (O'Rourke y Herskowitz, 1998; Hohmann, 2002; Macía *et al.*, 2009). Sln1 actúa como osmosensor, relacionado evolutivamente con los sensores de los sistemas de dos componentes descritos por primera vez en procariotas (Posas *et al.*, 1996), tiene actividad proteín-histidín quinasa, y se encuentra al inicio de una cascada de fosfotransferencia (Sln1-Ypd1-Ssk1). Sln1, en condiciones isosmóticas es activo y cataliza su propia fosforilación y la de la proteína intermediaria Ypd1, que transfiere a su vez un fosfato a Ssk1, evitando la interacción de esta proteína con las MAPKKs semiredundantes, Ssk2 y Ssk22. La fosforilación de Ssk1 mantiene la ruta inhibida, ya que sólo la forma no fosforilada de Ssk1 es capaz de unirse y activar a Ssk2 y Ssk22 (Posas y Saito, 1998; Horie *et al.*, 2008). El estrés hiperosmótico inhibe Sln1, con lo que aumenta la cantidad de Ssk1 no fosforilado, el cual interacciona con Ssk2 y Ssk22 para transmitir la señal (Tatebayashi *et al.*, 2003). Estas dos MAPKKs fosforilan a la MAPKK Pbs2, siendo esta última responsable de la doble fosforilación y activación de la MAPK Hog1 (Posas y Saito, 1997). Aunque Ssk2 y Ssk22 parecen redundantes en su habilidad para mediar la señalización a través



44

osmosensor y otra en la que es necesaria la participación de Sho1 como proteína osmosensora (Tatebayashi *et al.*, 2015). Además se ha demostrado la existencia de un tercer osmosensor, Opy2, una proteína integrada en la membrana plasmática que actúa en conexión con Sho1 y Ste50 (Wu *et al.*, 2006; Ekiel *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito una interacción entre el dominio SH3 de Sho1 y el transportador de glicerol Fps1 participando así esta proteína en la regulación positiva de Sho1. La delección de Fps1 provoca una disminución en la fosforilación de Hog1 en presencia de cloruro potásico (Lam *et al.*, 2015). Cuando Sho1 y algún receptor de esta rama reciben el estímulo, se produce la activación de Cdc42, que a su vez se une y estimula a la proteína quinasa Ste20 (Raitt *et al.*, 2000). El sustrato de Ste20 es la MAPKKK Ste11 que, además de estar asociada directamente con la MAPKK Pbs2 (Posas y Saito, 1997), se localiza a su vez en la membrana plasmática mediante asociación directa con la región citosólica de Sho1 (Zarrinpar *et al.*, 2004). Por último, Ste11 interacciona con el complejo Cdc42-Ste20 gracias a la proteína adaptadora Ste50 (Ramezani-Rad, 2003). También la unión de Ste50 con Opy2 facilita la transmisión del estímulo (Wu *et al.*, 2006). Por su lado, Pbs2 está unida a Sho1 por un dominio rico en prolinas de la región N-terminal (Maeda *et al.*, 1995) y a Hog1 (Posas y Saito, 1997), por lo que Pbs2, además de ser la MAPKK de la ruta, permite el correcto ensamblaje de los complejos proteicos necesarios para el inicio y propagación de la señal, actuando por tanto como proteína de andamiaje.

Así, entre las dos ramas existen 3 MAPKKKs (Ste11, Ssk2 y Ssk22) capaces de fosforilar y activar a la MAPKK Pbs2, la cual a su vez, fosforila y activa a Hog1 en los residuos Thr y Tyr de su dominio de activación. Por otro lado, tirosín fosfatasas (Ptp2 y Ptp3) y serín/treonín fosfatasas (Ptc1, Ptc2 y Ptc3) regulan negativamente a la MAPK Hog1 controlando así la intensidad y duración de la respuesta generada por esta vía (Saito y Tatebayashi, 2004; Martín *et al.*, 2005).

Finalmente, Hog1 activada se transloca al núcleo donde se une al DNA y fosforila varios factores de transcripción (Figura 4), que pueden actuar directamente o en colaboración con otros factores para regular la expresión de genes de respuesta a osmoestrés (Molín *et al.*, 2009; Romero-Santacreu *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2011). Estos genes contienen en sus promotores la secuencia STRE (*Stress Response Element*). Entre estos factores de transcripción se encuentran Smp1, el cual para su activación requiere una fosforilación directa por parte Hog1 (de Nadal *et al.*, 2003), y Msn1 que participa tanto en la respuesta a estrés osmótico como térmico (Rep *et al.*, 1999). Msn2 y Msn4 son factores de transcripción redundantes que se activan en respuesta a diversos tipos de estreses, incluido el estrés osmótico (Alepez *et al.*, 2001). El activador Hot1

está constitutivamente unido al promotor del gen *GPD1*, que codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, cuya activación por Hog1 controla la producción de glicerol en la célula (Alepuz *et al.*, 2001). Además Hog1 activa por fosforilación al represor Sko1 evitando así su unión con las regiones promotoras de los genes a los que regula. Por otro lado Hog1 interacciona con complejos remodeladores de cromatina (Mas *et al.*, 2009) y se ha mostrado que actúa como co-factor para la elongación de la transcripción de determinados genes (Proft *et al.*, 2006; de Nadal y Posas, 2010). Aunque la translocación al núcleo de Hog1 es necesaria para la fosforilación y activación de distintos factores de transcripción, se ha observado también fosforilación del canal de glicerol Fps1 por parte de esta MAPK en respuesta a ácido acético o arseniato, impidiéndose así la salida de glicerol de la célula (Tamas *et al.*, 1999; Thorsen *et al.*, 2006; Mollapour y Piper, 2007).

2.2. Ruta de integridad celular (CWI)

El mantenimiento de la pared celular en *S. cerevisiae* es de vital importancia, puesto que de ella dependen tanto la integridad como la morfología celular. La principal ruta de transducción de señales que se encarga del mantenimiento y la construcción de la pared celular cuando se produce alguna alteración de su estructura, es la ruta de integridad celular o CWI (*Cell Wall Integrity*) (Figura 5).

Esta ruta se activa tras el daño en la pared celular producido por el tratamiento con rojo Congo (García *et al.*, 2004), el blanco de Calcoflúor (Ketela *et al.*, 1999), la zimoliasa (Bermejo *et al.*, 2008) o la caspofungina (Reinoso-Martín *et al.*, 2003). También un choque hipoosmótico conduce a una activación rápida pero transitoria de la ruta (Davenport *et al.*, 1995). Sin embargo, la exposición a altas temperaturas (37-39°C) provoca la activación persistente de la ruta CWI (Kamada *et al.*, 1995), observándose lisis en mutantes carentes de alguno de los componentes de esta ruta cuando crecen a altas temperaturas (Torres *et al.*, 1991). Además, el tratamiento con feromonas estimula la señalización a través de la ruta CWI al mismo tiempo que se inicia el proceso de morfogénesis (Errede *et al.*, 1995). Entre otras situaciones que conducen a la activación de esta ruta se encuentran también el tratamiento con cafeína y vanadato (Martín *et al.*, 2000), el estrés de retículo endoplasmático (Scrimale *et al.*, 2009), defectos en O-glicosilación (Arroyo *et al.*, 2011), el estrés oxidativo (Alic *et al.*, 2003) y pH extremos (Claret *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006). Asimismo, mutaciones en genes importantes para la biogénesis de la pared celular como *FKS1*, *GAS1* y *MNN9* entre otros, dan lugar a una activación

permanente de la ruta, ya que estas células presentan una pared celular debilitada (de Nobel *et al.*, 2000; Lagorce *et al.*, 2003).

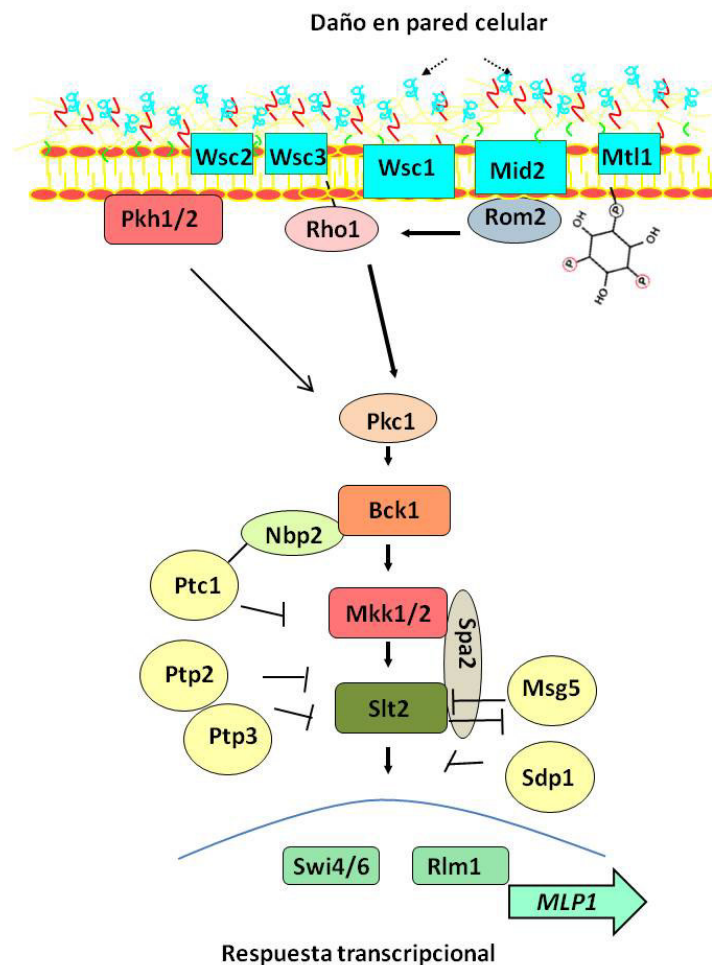


Figura 5: Representación esquemática de la ruta de integridad celular CWI en *S. cerevisiae*. La fórmula representa un fosatidilinositol-4,5-bisfosfato.

La ruta de integridad celular consta de una serie de sensores transmembranales que reconocen señales producidas en la pared celular y que las transmiten al resto de los componentes de la ruta. Estos componentes incluyen la GTPasa Rho1 y sus moduladores, que activa a la proteína quinasa C (Pkc1), y ésta a su vez al módulo conservado de MAPKs, constituido por la MAPKKK Bck1, dos MAPKKs redundantes Mkk1 y Mkk2, y la MAPK Slt2, también denominada Mpk1 (Figura 5). Esta MAPK actúa sobre los factores de transcripción Rlm1 y SBF (compuesto por Swi4 y Swi6) provocando cambios importantes en la transcripción de genes necesarios para la supervivencia celular, fundamentalmente a través de la remodelación de la pared celular (Levin, 2011). Se sabe además que la MAPK Slt2, una vez activada, fosforila a otros sustratos, como la proteína Sir3, que interviene en el silenciamiento génico transcripcional (Ray

et al., 2003), Bcy1, subunidad regulatoria de la PKA (Soulard *et al.*, 2010), la ciclina C (Jin *et al.*, 2014), el inhibidor de quinasas asociadas a ciclinas, Sic1 (Moreno-Torres *et al.*, 2015) y Nab2, proteína de unión a RNAm nuclear (Carmody *et al.*, 2010). Además, Slt2 retrofosforila componentes de la propia ruta CWI como Rom2, el factor intercambiador de GDP por -GTP (GEF) de Rho1; las MAPKKs: Mkk1 y Mkk2; y la fosfatasa Msg5, que actúa como regulador negativo de esta ruta (Molina *et al.*, 2010).

2.2.1. Sensores

Se conocen cinco sensores encargados de la detección de estímulos externos importantes para la activación de esta ruta: Wsc1 (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998), Wsc2, Wsc3, (Verna *et al.*, 1997), Mid2 y Mtl1 (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). Estos sensores son proteínas transmembrana de tipo I con una estructura semejante que consiste en un pequeño dominio citoplasmático en el extremo C-terminal, que determina la distribución de los sensores en la membrana (Straede y Heinisch, 2007), una región transmembrana y un dominio periplásmico rico en residuos de Ser/Thr (STR) altamente O-manosilado, siendo dicha manosiación esencial para la señalización (Jendretzki *et al.*, 2011). Además, los sensores de la familia Wsc presentan un dominio CRD rico en cisteínas (*Cysteine Rich Domain*) que es clave en la formación de puentes disulfuro entre moléculas de sensores y en la transmisión de la señal en situaciones de estrés (Dupres *et al.*, 2011). En estas condiciones se produce una agrupación de moléculas de Wsc1 en la membrana plasmática por medio de este dominio rico en cisteínas, formando microdominios denominados “sensomas”, incrementando así la activación de la ruta (Heinisch y Dufrene, 2010; Heinisch *et al.*, 2010; Kock *et al.*, 2015).

Estas proteínas actúan como mecanosensores que detectan cambios en la rigidez de la pared celular o de la membrana plasmática tras la exposición a estreses externos, funcionando como “nanomuelles” para transmitir la señal (Philip y Levin, 2001; Hutzler *et al.*, 2008; Dupres *et al.*, 2009; Heinisch *et al.*, 2010). Presentan una localización distinta, estando Mid2 uniformemente distribuido por toda la membrana plasmática durante el crecimiento vegetativo (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999; Straede y Heinisch, 2007) y Wsc1 en sitios de crecimiento polarizado (Delley y Hall, 1999; Straede y Heinisch, 2007). Dentro de este grupo de sensores, Wsc1 y Mid2 parecen tener un papel predominante, ya que participan en la señalización de la mayoría de los estímulos y actúan como principales activadores de la ruta CWI. Su carencia conduce a un fenotipo más grave, siendo el doble mutante *wsc1Δ mid2Δ* inviable en ausencia de un soporte osmótico (Rajavel *et al.*, 1999). Aunque cada sensor tiene un papel

diferente en función de la naturaleza del estrés, ambos participan en la respuesta a estrés térmico (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Ketela *et al.*, 1999). Las respuestas a caspofungina (Reinoso-Martín *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2010) o pH alcalino (Serrano *et al.*, 2006) son dependientes de Wsc1, mientras que la activación transcripcional producida por rojo Congo está regulada principalmente por Mid2, siendo solo una pequeña parte de la respuesta dependiente de Wsc1 (Bermejo *et al.*, 2010). Otros estreses como las feromonas (Errede *et al.*, 1995), choque térmico, blanco de Calcoflúor (Ketela *et al.*, 1999; de Nobel *et al.*, 2000), vanadato (Martín *et al.*, 2000) o pH ácido (Claret *et al.*, 2005) también son detectados por Mid2. Sin embargo, ninguno de estos dos sensores ejerce un papel en la respuesta producida por la zimoliasa, ya que este estímulo es exclusivamente reconocido por Sho1 de la ruta HOG (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009; Bermejo *et al.*, 2010; Rodríguez-Peña *et al.*, 2013). Por último, Mtl1 responde principalmente a estrés oxidativo (Vilella *et al.*, 2005; Petkova *et al.*, 2012) y junto con Wsc1 o Mid2 regula la distribución de la ciclina C y participa en la muerte celular programada de *S. cerevisiae* (Jin *et al.*, 2013). Tras reconocer el daño en la pared, los dominios citoplasmáticos C-terminales de Wsc1 y Mid2 interaccionan con las GEFs Rom1/2, favoreciendo así la activación de Rho1 (Philip y Levin, 2001).

2.2.2. Rho1 y Pkc1

Rho1 es una GTPasa perteneciente a la familia RHO esencial dentro de esta cascada de señalización y necesaria para la viabilidad celular. Se encuentra en la membrana plasmática y se localiza en sitios de crecimiento polarizado (Andrews y Stark, 2000), conjuntamente con los parches de actina (Yamochi *et al.*, 1994). Esta GTPasa además de formar parte de la ruta CWI, juega un papel muy importante en la organización de la pared celular ya que regula la actividad de Fks1, la β -1,3 glucan sintasa (Cabib *et al.*, 1997; Roh *et al.*, 2002; Roumanie *et al.*, 2005), mediante su asociación a la membrana plasmática por un grupo isoprenilo en el extremo C-terminal (Inoue *et al.*, 1999). Rho1 se relocaliza con Fks1 durante la formación del septo (Mazur y Baginsky, 1996). Por otro lado, también participa en la polarización del citoesqueleto de actina mediante la activación de las forminas Bni1 y Bnr1 (Kohno *et al.*, 1996; Evangelista *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1998), así como en la regulación de la exocitosis (Roumanie *et al.*, 2005) y en la expresión de genes relacionados con la biogénesis de la pared, por medio del factor transcripcional Skn7 (Alberts *et al.*, 1998) (Figura 6).

Rho1 es una proteína G monomérica que oscila entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP, regulada negativamente por proteínas que estimulan la actividad

GTPasica, denominadas GAPs (*GTPase Activating Protein*) y positivamente por factores intercambiadores del guanosina o GEFs (*Guanosine Exchangers Factors*). Bem2, Sac7, Bag7 y Lrg1 son las GAPs implicadas en la regulación negativa de Rho1 (Martín *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2002). Por el contrario, Rho1 es activada mayoritariamente a través de las GEFs Rom1/2 (Ozaki *et al.*, 1996) y Tus1 (Schmelzle *et al.*, 2002), promoviéndose el intercambio de GDP por GTP. A diferencia de Tus1, que parece que solo activa Rho1 en respuesta a señales intracelulares (Kono *et al.*, 2008), Rom1 y Rom2 presentan un dominio N-terminal responsable de la asociación con los sensores Wsc1 y Mid2 y además tienen un dominio PH que le permite unirse al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns-4,5P₂). Este dominio, junto con la interacción con los sensores, es responsable de reclutar las GEFs a la membrana plasmática para focalizar su acción en sitios de crecimiento polarizado (Philip y Levin, 2001).

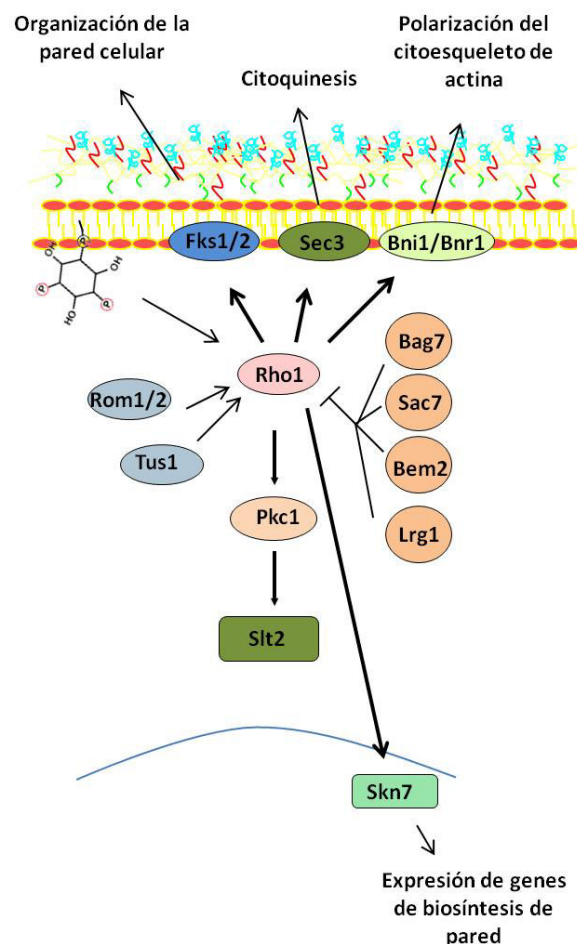


Figura 6: Regulación de la GTPasa Rho1 y dianas sobre las que actúa.

La activación de Rho1 depende de Rom2 en la mayoría de las situaciones de estrés de pared celular que conducen a la activación de la ruta, pero hay que destacar el papel de Tus1,

que además participa en la regulación del ciclo celular mediando la activación de Cdc28 hacia Rho1 (Kono *et al.*, 2008). Tanto el complejo Cdc28/Cdk1 como Cdc5 fosforilan a Tus1, lo que conlleva a la activación de Rho1, participando esta última en los eventos necesarios para la polarización del citoesqueleto de actina, necesaria para la citoquinesis (Kono *et al.*, 2008). También es interesante el hecho de que Rom2 sea activado por Tor2, una serín/treonín quinasa que regula el crecimiento celular y controla la organización del citoesqueleto de actina, llevando a cabo de esta forma la activación de Rho1 y de la ruta de integridad celular (Helliwell *et al.*, 1998; Loewith *et al.*, 2002). Rho1, en respuesta a un daño en pared, activa a la proteína quinasa C, codificada por el gen *PKC1* (Nonaka *et al.*, 1995).

El gen *PKC1* codifica una proteína quinasa homóloga a las proteínas quinasa C de mamíferos y fue el primer componente de la ruta de integridad celular identificado (Levin *et al.*, 1990). De todos los dominios de las 10 isoformas de la quinasa C observados en mamíferos y conservados en Pkc1 de levadura, sólo los dominios C1B y HR1A, que median la interacción con la GTPasa Rho1 (Schmitz *et al.*, 2002), el dominio quinasa y el dominio pseudosustrato, tienen una función *in vivo* (Heinisch, 2005). A diferencia del resto de los miembros de la familia de proteínas quinasa C, no presenta actividad dependiente de calcio, ya que carece del dominio regulatorio de unión a este catión.

Pkc1 se localiza intracelularmente en sitios de crecimiento polarizado siguiendo un patrón muy similar al de Rho1 (Andrews y Stark, 2000) y, al igual que ocurre con esta GTPasa, es importante para la correcta formación del anillo de septinas. En las fases G1 y S se localiza en las yemas emergentes o en la parte apical de éstas, durante la fase G2 se despolariza y durante la mitosis se ubica en el cuello entre la célula madre y la yema asociada al anillo de septinas (Denis y Cyert, 2005).

Una vez unida a Rho1, Pkc1 se activa (Kamada *et al.*, 1996). Pero, además de la regulación por Rho1, Pkc1 es regulable por fosforilación a través de las quinasas Pkh1 y Pkh2 (Inagaki *et al.*, 1999), necesarias para lograr una activación total de Pkc1. La pérdida de función de cualquiera de los componentes de la cascada de MAPKs bajo su control conduce a una lisis celular atribuida a una deficiencia en la construcción de la pared celular, pero la delección tanto de esta quinasa como de la GTPasa Rho1 da lugar a fenotipos más graves, lo que indica que estas dos proteínas deben de estar implicadas en la regulación de otras rutas celulares (Levin, 2011). Se ha relacionado a Pkc1 con la activación de la formina Bni1 (Dong *et al.*, 2003) y la regulación

del citoesqueleto de actina promovida por Tor2 (Helliwell *et al.*, 1998). Además participa en la respuesta frente a estrés genotóxico (Soriano-Carot *et al.*, 2014) y en la regulación del huso mitótico (Khalfan *et al.*, 2000; Hosotani *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de que se le atribuyen varios sustratos intracelulares, únicamente se conoce con detalle su regulación sobre el módulo de quinasas Bck1-Mkk1/2-Slt2.

2.2.3. Módulo de MAPKs

Este módulo es el núcleo central de la ruta de integridad en el que la señal se transmite por fosforilaciones y activaciones secuenciales (Figura 5). Pkc1 fosforila al primer eslabón del módulo de MAPKs, la MAPKKK Bck1 (Lee y Levin, 1992). Bck1 fosforila y activa a un par de MAPKKs, Mkk1 y Mkk2 (Irie *et al.*, 1993), que activan a su vez, en último lugar, a la MAPK Slt2 (Torres *et al.*, 1991; Soler *et al.*, 1995).

Bck1 es fosforilada *in vitro* por Pkc1 en varios residuos implicados en su activación (Ser⁹³⁹, Thr¹¹¹⁹, Ser¹¹³⁴), en una región bisagra entre su dominio regulatorio N-terminal y su dominio catalítico C-terminal (Levin *et al.*, 1994). Determinadas mutaciones en esta región producen una activación constitutiva de la proteína y por tanto de la ruta (Martín *et al.*, 2000), lo que ha permitido rescatar en multitud de ocasiones fenotipos de sensibilidad en diferentes mutantes y situaciones de estrés de pared celular (Levin *et al.*, 1994).

Bck1 fosforila a las MAPKKs Mkk1 (en los residuos Ser³⁷⁷ y Thr³⁸¹) y Mkk2, responsables de la activación de Slt2 (Irie *et al.*, 1993; Kamada *et al.*, 1995; Paravicini y Friedli, 1996). Estas MAPKKs son redundantes, ya que cualquiera de ellas es capaz de mantener la funcionalidad de la ruta de integridad celular, si bien Mkk1 tiene un papel preponderante en la transmisión de la señal hacia Slt2 (Martín *et al.*, 2000; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007; Tatjer *et al.*, 2016). La sobreexpresión de un alelo hiperactivo de *MKK1* como resultado de la mutación de una serina a prolina en la posición 386 (*MKK1*^{S386P}) provoca muerte celular incluso en ausencia de elementos que se encuentren localizados por encima de la MAPKK. Esto indica que una hiperactivación de la ruta CWI de forma constitutiva es letal (Watanabe *et al.*, 1995).

Mkk1 y Mkk2, en condiciones de activación de la ruta, fosforilan y activan a la MAPK Slt2 en los residuos Thr¹⁹⁰-Glu-Tyr¹⁹² (Lee *et al.*, 1993). Esta MAPK es la homóloga funcional de la MAPK ERK5 de humanos (Truman *et al.*, 2006) y se describió inicialmente como supresora del fenotipo lítico de los mutantes *lyt2Δ* (Torres *et al.*, 1991) y *bck1Δ* (Lee *et al.*, 1993). La

interacción con las MAPKKs se da entre el dominio N-terminal no catalítico de Mkk1 y Mkk2 y el extremo N-terminal con actividad quinasa de Slt2 (Soler *et al.*, 1995). Se ha descrito una retrofosforilación de Slt2 sobre sus MAPKK, tras condiciones de activación, que podría tener un cierto papel en la retroalimentación negativa de la ruta (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007).

Slt2 se encuentra fundamentalmente en el núcleo, si bien constitutivamente transita entre éste y el citoplasma, mientras que Mkk1, Mkk2 y Bck1 son principalmente citoplasmáticos (van Drogen y Peter, 2002). Además una pequeña proporción de Slt2, Mkk1 y Mkk2 se localiza de manera dependiente del ciclo celular en el ápice de la yema en emergencia y en el plano de citoquinesis entre la célula madre y la yema. También se localizan en la punta de la prolongación que se produce en las células en respuesta a feromonas. La localización de Slt2, Mkk1 y Mkk2 en estos sitios es dependiente de Spa2, uno de los elementos fundamentales del complejo de polaridad o “polarisoma”. Spa2 interacciona por el sistema del doble híbrido con Slt2 (Van Drogen y Peter, 2002) y con Mkk1 y Mkk2, siendo el dominio SHD-1 de Spa2 (residuos 1-120) y los primeros 150 aminoácidos de Mkk1 y Mkk2 los implicados en la interacción (Sheu *et al.*, 1998). Todo esto lleva a proponer a Spa2 como proteína de andamiaje de la ruta CWI en sitios de crecimiento polarizado (van Drogen y Peter, 2002) (Figura 5).

La MAPK Slt2 está regulada negativamente por proteínas fosfatasa que controlan su nivel de activación (Martín *et al.*, 2005) (Figura 5). La principal fosfatasa implicada en la desfosforilación de Slt2 tras la activación de la ruta es la tirosín fosfatasa Ptp2, y en menor medida Ptp3 (Mattison *et al.*, 1999), mientras que la proteína fosfatasa de especificidad dual Msg5 está implicada principalmente en mantener bajos los niveles de activación de Slt2 en condiciones basales. A su vez, Slt2 regula a Msg5, ya que ésta es fosforilada por Slt2 en condiciones de activación (Flández *et al.*, 2004). Mientras que Msg5 es también responsable de la desfosforilación de Fus3, la fosfatasa de especificidad dual Sdp1 parece actuar específicamente sobre Slt2 (Collister *et al.*, 2002; Hahn y Thiele, 2002). Ptc1 es una serín/treonín fosfatasa que regula tanto la ruta de integridad celular (González-Novo *et al.*, 2015; Tatjer *et al.*, 2016) como la ruta de respuesta a alta osmolaridad (Maeda *et al.*, 1994; Warmka *et al.*, 2001) y la ruta de apareamiento (Malleshaiah *et al.*, 2010). Para que esta fosfatasa ejerza la mayoría de sus funciones es necesaria la proteína adaptadora Nbp2 (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Hruby *et al.*, 2011). Se sabe que en la ruta CWI, Nbp2 interacciona con Bck1 (Hruby *et al.*, 2011; Stanger *et al.*, 2012) para reclutar a Ptc1 que actúa a nivel de Mkk1 y Mkk2 (Tatjer *et al.*, 2016). La desfosforilación e inactivación de las MAPKs por las proteínas fosfatasas es una de las formas más

directas de modular tanto la duración como la intensidad de la respuesta generada por las rutas de MAPKs. De lo contrario, la activación descontrolada de estas proteínas podría llegar a ser perjudicial para la célula (Martín *et al.*, 2005).

Slt2, además de activarse por estímulos que afectan a la pared celular, se encuentra también fosforilada y activa en condiciones de estrés genotóxico (radiaciones UV, metil-metano sulfonato o hidroxurea) (Queralt y Igual, 2005; Dardalhon *et al.*, 2009; Bandyopadhyay *et al.*, 2010; Soriano-Carot *et al.*, 2014) mitofagia (Mao y Klionsky, 2011) y pexofagia (Manjithaya *et al.*, 2010). En respuesta a la despolarización del citoesqueleto de actina se produce una activación de la ruta CWI y una parada del ciclo celular en G2. Se ha propuesto que Slt2 actúa inhibiendo la fosfatasa Mih1, lo que provoca un desequilibrio hacia la fosforilación de Cdc28 (quinasa dependiente de ciclina que regula la entrada en mitosis) por parte de la quinasa Swe1 y una parada del ciclo celular (Harrison *et al.*, 2001).

Una vez que Slt2 está fosforilada, esta MAPK se asocia a la chaperona Hsp90, lo cual resulta esencial para que Slt2 pueda cambiar su localización del citoplasma al núcleo y activar al factor de transcripción Rlm1 (Millson *et al.*, 2005).

2.2.4. Factores de transcripción

Rlm1 es el principal factor de transcripción responsable de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de la pared (*GFA1*, *CHS3*, *CRH1*, *BGL2*), el metabolismo, la generación de energía y la regulación de la ruta de integridad celular (*SLT2*, *MID2*, *PTP2*, *MSG5*, *MLP1*) (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en mutantes de otros componentes de la ruta de integridad celular, la delección de *RLM1* no produce fenotipos de sensibilidad a estímulos que afectan a la pared celular, excepto el de sensibilidad a cafeína (Watanabe *et al.*, 1995). El gen *RLM1* (*Resistant to the Lethality of Mkk1^{S386P}*) fue identificado en un escrutinio genético dirigido a la identificación de mutantes resistentes a la inhibición de crecimiento causada por la sobreexpresión del alelo hiperactivo *MKK1^{S386P}* (Watanabe *et al.*, 1995). Además, Rlm1 activa la expresión de Slt2 y del propio Rlm1, lo que sugiere un mecanismo de autorregulación para amplificar la señal (García *et al.*, 2004).

Rlm1 presenta un dominio N-terminal de unión a DNA y dimerización de proteínas, relacionado con la caja MADS. Gracias a este dominio, la especificidad de unión es similar a la del factor de transcripción de mamíferos MEF2 y está estrechamente relacionado con el factor de

transcripción Smp1 de la ruta HOG (Dodou y Treisman, 1997). Por otro lado, el dominio C-terminal de Rlm1 (residuos 526-676) es necesario para la activación transcripcional (Dodou y Treisman, 1997). También presenta una región que contiene un dominio D por el que se une a Slt2 (Watanabe *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002) y dos residuos principales para la fosforilación por Slt2 (Ser⁴²⁷ y Thr⁴³⁹), presentes en su dominio de activación, que promueven su actividad transcripcional, aunque existe otro tercer residuo, la Ser³⁷⁴, potencialmente susceptible de fosforilación por la MAPK (Jung *et al.*, 2002).

Jung y Levin, en 1999, identificaron 25 genes regulados por este factor de transcripción en respuesta a la hiperactivación de la ruta CWI, por la sobreexpresión del alelo mutante *MKK1^{S386P}*. Todos ellos presentaban secuencias de unión a Rlm1. El número de genes se ha ampliado en trabajos posteriores (Rodríguez-Peña *et al.*, 2000; Lagorce *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2009; García *et al.*, 2009; Marín *et al.*, 2009) donde se han analizado los perfiles de expresión génica mediante *microarrays* de DNA, de cepas silvestres o de mutantes en elementos de la ruta CWI, en condiciones de activación de esta ruta, para así definir la respuesta generada y la participación directa de estos elementos en su regulación. El núcleo principal de la respuesta en las diferentes situaciones que conducen a daños en la pared celular es similar y la inducción de genes implicados en la biogénesis de la pared, metabolismo y generación de energía, morfogénesis, transducción de señales y estrés es común a la mayoría de las respuestas. Se ha identificado un grupo de 18 genes fuertemente inducidos en presencia de rojo Congo, zimoliasa y caspofungina que se considera la “huella transcripcional” de la respuesta en situaciones de estrés sobre la pared (Arroyo *et al.*, 2009). Una respuesta transcripcional similar se ha observado en mutantes afectados en diferentes procesos de la construcción de pared celular, como la biosíntesis de β -1,3 y β -1,6 glucano (*fks1Δ* y *kre6Δ*), la manosilación de proteínas de pared (*mnn9Δ*), el entrecruzamiento de componentes de la pared celular (*gas1Δ*) y la coordinación entre la síntesis de pared y el crecimiento celular (*knr4Δ*) (Lagorce *et al.*, 2003).

Además se ha observado que en presencia de zimoliasa se activan genes que dependen tanto de la ruta de integridad como de la ruta de respuesta a alta osmolaridad (HOG), y en el caso de algunos de ellos, como ocurre con *CRH1* (que codifica una proteína involucrada en remodelación de pared) (Rodríguez-Peña *et al.*, 2000), la inducción transcripcional, aunque está mediada por Rlm1, necesita de elementos de la ruta de HOG (Bermejo *et al.*, 2008). No se conoce muy bien el mecanismo por el cual sucede esto, pero aunque este daño en pared es detectado por los sensores Hkr1 y Msb2, que opera en la rama Sho1 de la ruta HOG, por debajo

de Sho1 debe producirse una conexión entre la ruta HOG y la ruta CWI, necesaria para la activación de Slt2 (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009). Por tanto, el daño celular producido por la zimoliasa implicaría dos respuestas transcripcionales diferentes: una respuesta principal relacionada con la adaptación a defectos en la integridad de la pared celular, regulada por Slt2 y Rlm1, que requiere la participación de elementos de la rama SHO1 de la ruta HOG; y una respuesta de adaptación a estrés osmótico llevada a cabo por Msn2/4, que incluiría los genes que responden a bajos niveles de activación de Hog1 (García *et al.*, 2009).

Uno de los genes cuya activación transcripcional dependiente de Rlm1 es mayor, es el que codifica la pseudoquinasa Mlp1 (Hanks y Hunter, 1995; Kim *et al.*, 2008), una proteína paróloga de Slt2. Dado que *MLP1* se induce transcripcionalmente en respuesta a múltiples situaciones de estrés sobre la pared celular (Agarwal *et al.*, 2003; Lagorce *et al.*, 2003; García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009), se utiliza de manera generalizada como gen reportero de la ruta de integridad celular (Arias *et al.*, 2011). Slt2 y Mlp1 comparten el 53% de la secuencia aminoacídica, pero Mlp1 carece del motivo de activación conservado en las MAPKs (teniendo reemplazada la treonina por una lisina (Watanabe *et al.*, 1997) y de otros dominios esenciales para la actividad catalítica (Hanks y Hunter, 1995). Esta pseudoquinasa interacciona por el dominio CD (*Common Docking*) con Rlm1 en ensayos de doble híbrido (Watanabe *et al.*, 1997), lo que sugiere que Mlp1 puede afectar a la ruta CWI a través de este factor de transcripción. La delección de *MLP1* no produce ningún fenotipo detectable, aunque el doble mutante *slt2Δ mlp1Δ* es más sensible a cafeína que el mutante sencillo *slt2Δ* y la sobreexpresión de *MLP1* suprime el fenotipo de sensibilidad a cafeína observado en un mutante *bck1Δ*, mientras que es incapaz de suprimir el defecto en crecimiento a altas temperaturas (Watanabe *et al.*, 1997). Se ha descrito que tanto Mlp1, que es catalíticamente inactiva, como Slt2 de forma independiente de su actividad quinasa, pueden activar la transcripción de genes como *FKS2* a través de un mecanismo no catalítico mediante su asociación con el factor de transcripción Swi4 en el promotor de dicho gen (Truman *et al.*, 2006; Truman *et al.*, 2009; Kim y Levin, 2010).

Otro factor de transcripción activado por Slt2 es SBF (Madden *et al.*, 1997), que activa la transcripción de genes implicados en la regulación del ciclo celular y del crecimiento polarizado. SBF es un complejo heterodimérico formado por las proteínas Swi4 y Swi6 (Breedon y Nasmyth, 1987; Andrews y Herskowitz, 1989; Taba *et al.*, 1991). Swi4 es la subunidad de unión a DNA de secuencia específica, aunque necesita a Swi6, la subunidad reguladora, para dicha unión. SBF

principalmente activa la expresión de las ciclinas de la fase G1 (Cln1, Cln2, Pcl1 y Pcl2) que se unen a Cdc28 regulando la transición de fase G1 a S (Iyer *et al.*, 2001).

Hay varias evidencias que sustentan la relación entre el complejo SBF y la ruta de integridad como el hecho de que la sobreexpresión de Swi4 es capaz de suprimir el fenotipo de lisis celular de un mutante *slt2Δ* (Madden *et al.*, 1997) o que los mutantes *swi4Δ* y *swi6Δ* son hipersensibles a blanco de Calcoflúor (Igual *et al.*, 1996). Además, Slt2 coprecipita con SBF *in vivo* y lo fosforila *in vivo* e *in vitro* en respuesta a estrés de pared (Madden *et al.*, 1997), e interacciona *in vitro* con Swi4 (Baetz *et al.*, 2001). Se ha demostrado que SBF juega cierto papel en la regulación de genes de respuesta a estrés sobre la pared celular (Kim *et al.*, 2008; Kim y Levin, 2010). El complejo SBF regula la activación transcripcional de los genes *FKS2* (Kim *et al.*, 2008), *CHA1*, *YLR042C* e *YKR013W* (Kim y Levin, 2010), caracterizados por inducirse en situaciones de daño sobre la pared celular independientemente de Rlm1 (García *et al.*, 2004). Como se ha comentado anteriormente, estos genes son activados a través de un mecanismo no catalítico por la forma activa o fosforilada de la MAPK Slt2 y su pseudoquinasa Mlp1, que forman un complejo con Swi4 que se asocia a los promotores de los genes diana independientemente de Swi6 (Kim *et al.*, 2008; Kim y Levin, 2010). Sin embargo, el reclutamiento posterior de Swi6 es necesario para la activación de la transcripción. Además, se ha descrito recientemente que Slt2 posee también una función no catalítica en el proceso de elongación, a través de su interacción con el complejo asociado a la RNA Pol II, Paf1C (Kim y Levin, 2011).

Skn7 es un factor de transcripción relacionado con la biosíntesis y el mantenimiento de la pared celular a través de la ruta CWI, mediante su regulación por parte de Rho1 (Figura 6) con el que interacciona (Alberts *et al.*, 1998). También regula la expresión de *OCH1*, una α -1,6 manosiltransferasa involucrada en la maduración de las N-glicoproteínas (Li *et al.*, 2002) y de *NCA3* que codifica una proteína de la pared importante para la formación del septo (Shankarnarayan *et al.*, 2008) en respuesta a un choque hipoosmótico y de manera dependiente de Sln1. Además se une y estabiliza el factor de transcripción Crz1 implicado en el mantenimiento de la pared celular y en ausencia del dominio de unión a Rho1 se bloquea este efecto (Williams y Cyert, 2001). Skn7 coopera con Swi4/Swi6 regulando el ciclo celular (Bouquin *et al.*, 1999), con el factor de transcripción Hsf1 de respuesta a choque térmico (Raitt *et al.*, 2000), con Yap1, un factor de transcripción activado por estrés oxidativo (Morgan *et al.*, 1997) y está implicado en el crecimiento filamentoso en ausencia de nitrógeno (Hohmann, 2002).

3. INTERRELACIÓN DE LA RUTA CWI CON DIVERSOS COMPONENTES Y PROCESOS ESENCIALES EN LA MORFOGÉNESIS CELULAR

3.1. Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina desempeña un papel importante en diversos procesos fundamentales de *S. cerevisiae* como el mantenimiento de la morfología y la polaridad celular (Bridges y Gladfelter, 2015), la citoquinesis (Bi, 2001; Balasubramanian *et al.*, 2004; Wloka y Bi, 2012) o el tráfico vesicular (Engqvist-Goldstein *et al.*, 2004; Loebrich, 2014). En *S. cerevisiae* el citoesqueleto se organiza en tres estructuras principales: los parches de actina, estructuras dinámicas que se generan en la membrana plasmática y marcan lugares donde se inicia la endocitosis y dónde se sintetiza de manera localizada la pared celular (Schott *et al.*, 2002); los cables, largos haces de filamentos de actina que se orientan en el sentido del eje de crecimiento polarizado y son las vías conductoras a través de las cuales se produce el transporte de vesículas unidireccionalmente hacia el lugar de crecimiento polarizado; y el anillo de actomiosina, una estructura contráctil que permite que se lleve a cabo el proceso de citoquinesis una vez se ha producido la mitosis (Bi, 2001; Bi y Park, 2012).

Los filamentos de actina (actina-F) son el resultado de la polimerización de actina en la forma monomérica globular (actina-G). La conversión entre ambas formas es un proceso dinámico regulado por la actividad coordinada de cerca de 100 proteínas accesorias, altamente conservadas, como son las forminas Bni1 y Bnr1 o el complejo Arp2/3 que promueven su nucleación, o la cofilina, encargada de su despolimerización (Campellone y Welch, 2010). Frecuentemente, las proteínas reguladoras de la polimerización ejercen su función gracias a su interacción con los fosfoinosítidos de la membrana plasmática.

Las GTPasas de la familia Rho (Rho1, 2, 3 y 4 y Cdc42) son responsables de generar y mantener la polaridad celular (Pruyne y Bretscher, 2000; Slaughter *et al.*, 2009; Pérez y Rincón, 2010; Johnson *et al.*, 2011; Bi y Park, 2012). Cdc42 es la principal GTPasa responsable de coordinar la polaridad en *S. cerevisiae*, ya que se concentra en un punto concreto, haciendo así que los cables de actina se orienten específicamente hacia este lugar y la secreción de la célula se polarice en este sentido (Park y Bi, 2007). Además de la GTPasa Cdc42, Rho1 también interacciona con las forminas Bni1 y Bnr1 (Figura 7), manteniendo la polaridad celular durante el crecimiento de la yema. Esta GTPasa, en respuesta a estrés, puede regular el citoesqueleto de actina (Dong *et al.*, 2003). Tras un choque térmico, el citoesqueleto se despolariza por toda la

periferia celular (Lillie y Brown, 1994; Desrivieres *et al.*, 1998). Este proceso es dependiente de Rho1, su GEF Rom2 y Pkc1, pero independiente del resto de componentes de la ruta de integridad celular (Levin, 2005). A su vez, una despolarización del citoesqueleto es interpretada como un estrés sobre la pared, ya que activa la ruta CWI de manera dependiente de Rho1 y Pkc1 y esta activación está bloqueada en presencia de un soporte osmótico (Torres *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 2004). Por otro lado, la ruta CWI es necesaria para repolarizar el citoesqueleto de actina después de un estrés sobre la pared (Delley y Hall, 1999). Rho1 también regula el citoesqueleto de actina en una vía paralela a la ruta CWI y de manera dependiente de Tor2, una serín/treonín quinasa que activa Rho1 a través de Rom2 (Schmidt *et al.*, 1997; Helliwell *et al.*, 1998).

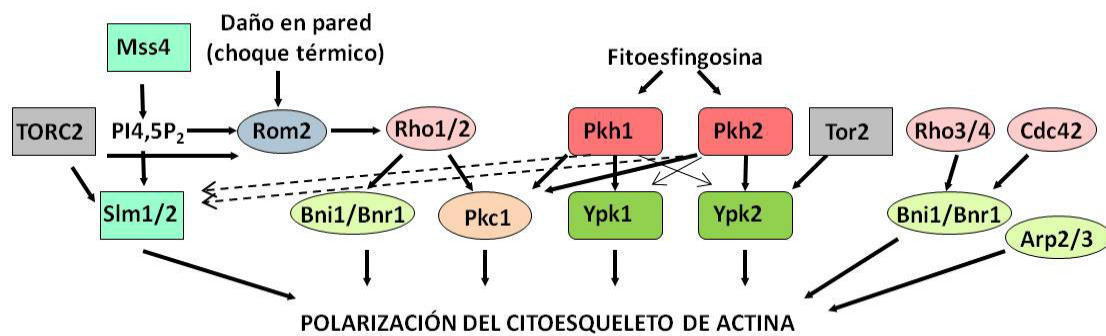


Figura 7: Proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina.

El citoesqueleto de actina, además de por GTPasas, está regulado por las proteínas quinasas Pkh1/2 y Ypk1/2 que comentaremos en el siguiente apartado y por Slm1/2, proteínas que presentan dominios PH de unión a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns-4,5P₂) (Figura 7). En respuesta a un choque térmico, Slm1/2 son reclutadas a la membrana, interaccionan con el complejo TORC2 y son fosforiladas para regular la polimerización del citoesqueleto (Audhya *et al.*, 2004; Fadri *et al.*, 2005). Se ha descrito que la fosforilación de Slm1 depende de las quinasas Pkh1/2 (Daquinag *et al.*, 2007), aunque no se ha observado fosforilación directa. Además se ha descrito que en respuesta a un choque térmico se inicia la desfosforilación de Slm1/2 mediada por la proteína fosfatasa calcineurina (Bultynck *et al.*, 2006; Daquinag *et al.*, 2007) y se cree que su refosforilación posterior está relacionada con la activación de la ruta Pkh1/2 en respuesta a la composición en esfingolípidos de membrana (Bultynck *et al.*, 2006; Daquinag *et al.*, 2007) (Figura 7).

3.2. Pkh1/Pkh2

Proteínas quinasas homólogas a las quinasas PDKs (*3-phosphoinositide-dependent protein kinases*) de eucariotas superiores (Casamayor *et al.*, 1999) que transmiten la señal a las quinasas redundantes Ypk1/2 (Pkh1 fosforila preferentemente a Ypk1 en Thr⁵⁰⁴ mientras que Pkh2 fosforila a Ypk2 en Thr⁵⁰¹) (Casamayor *et al.*, 1999; Roelants *et al.*, 2002) (Figura 8). Se ha descrito que para que Pkh1/2 fosforilen Ypk2, es necesaria la fosforilación previa de esta quinasa por parte de Tor2 y que el motivo que se fosforila está conservado en Ypk1, aunque no se ha demostrado que éste sea fosforilado por Tor2 (Kamada *et al.*, 2005). Pkh1/2, a través de esta vía, participan en la regulación del citoesqueleto de actina y de la endocitosis (Friant *et al.*, 2001; deHart *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Además, Ypk1/2 tienen un papel clave en la proliferación celular (Chen *et al.*, 1993) y la traducción durante la falta de nitrógeno (Gelperin *et al.*, 2002).

En cuanto al mantenimiento de la integridad celular, las quinasas Pkh1/2 y Ypk1/2 han sido propuestas como activadores indirectos de la MAPK de la ruta CWI ya que un mutante *ypk1Δ* presenta menor activación de Slt2 en respuesta a un choque térmico (Schmelzle *et al.*, 2002). Estas quinasas son proteínas esenciales y tienen función redundante en el mantenimiento de la integridad celular (Inagaki *et al.*, 1999) constituyendo una vía paralela a Rho1 para activar a Pkc1 (Figura 8). Un mutante *pkh1^{Ts} pkh2Δ* es deficiente en la inducción de Rlm1, muestra despolarización del citoesqueleto de actina y lisis celular a temperatura restrictiva y en ausencia de soporte osmótico. En este mutante, la activación constitutiva de Pkc1, Bck1 o Mkk1 recupera el crecimiento (Inagaki *et al.*, 1999; Roelants *et al.*, 2002). Además se sabe que tanto Pkh1 como Pkh2 fosforilan *in vitro* la Thr⁹⁸³ de Pkc1 (Friant *et al.*, 2001), un residuo análogo a los sitios de fosforilación de las quinasas dianas de PDK1 de mamífero. La función de estas quinasas es requerida para la completa activación de Pkc1 en respuesta a un choque térmico y la eliminación del sitio de fosforilación en Thr⁹⁸³ de Pkc1 provoca la pérdida de su funcionalidad. Sin embargo, otros autores han descrito que estas quinasas podrían actuar de manera paralela a la ruta de integridad celular y de este modo activar genes implicados en la remodelación de la pared celular de manera independiente de la ruta CWI, por medio del factor de transcripción Smp1 (Roelants *et al.*, 2002).

Pkh1 y 2 se localizan principalmente en la punta cortical, en sitios distintos a los parches de actina, pudiendo coincidir con las “balsas lipídicas” (Roelants *et al.*, 2002), microdominios de membrana enriquecidos en esfingolípidos y esteroides. Estas “balsas lipídicas” son importantes para el envío de ciertas proteínas a la superficie celular de la levadura (Bagnat *et al.*, 2000) y

participan en la regulación de las vías de transducción de señales. A diferencia de PDK1 de mamíferos, que es activada por su interacción con fosfoinosítidos (Toker y Newton, 2000) o esfingosina (King *et al.*, 2000), Pkh1/2 no se activan por fosfoinosítidos pero *in vitro* son estimuladas por concentraciones nanomolares de fitoesfingosina (Friant *et al.*, 2001). Además se ha demostrado que estos esfingolípidos regulan, tanto *in vivo* como *in vitro*, la actividad de Pkh1/2 para que fosforilen y activen a sus sustratos (Ypk1/2 y Sch9) (Liu *et al.*, 2005) (Figura 8). Existen dos hipótesis acerca del papel de la ruta Pkh1/2 en relación con la pared celular. Una es que el crecimiento de la membrana plasmática, por la fusión de vesículas enriquecidas en esfingolípidos, sea monitorizado y acompasado por la expansión de la pared celular a través de la vía Pkh1/2 (Roelants *et al.*, 2002). La otra posibilidad es que el requerimiento de esfingolípidos señalice a Pkh1/2 para su función en endocitosis, ya que un mutante *pkh1/2Δ ypk^{Ts}*, al igual que un mutante *lcb1Δ* que presenta deficiencia en la biosíntesis de esfingolípidos, es deficiente en endocitosis (Friant *et al.*, 2001). Sin embargo, ya que el ensamblaje de la actina es esencial para la endocitosis (Shaw *et al.*, 2001) y que mutantes en estas proteínas presentan deficiencia en la polimerización de actina, los efectos en la endocitosis pueden ser indirectos.

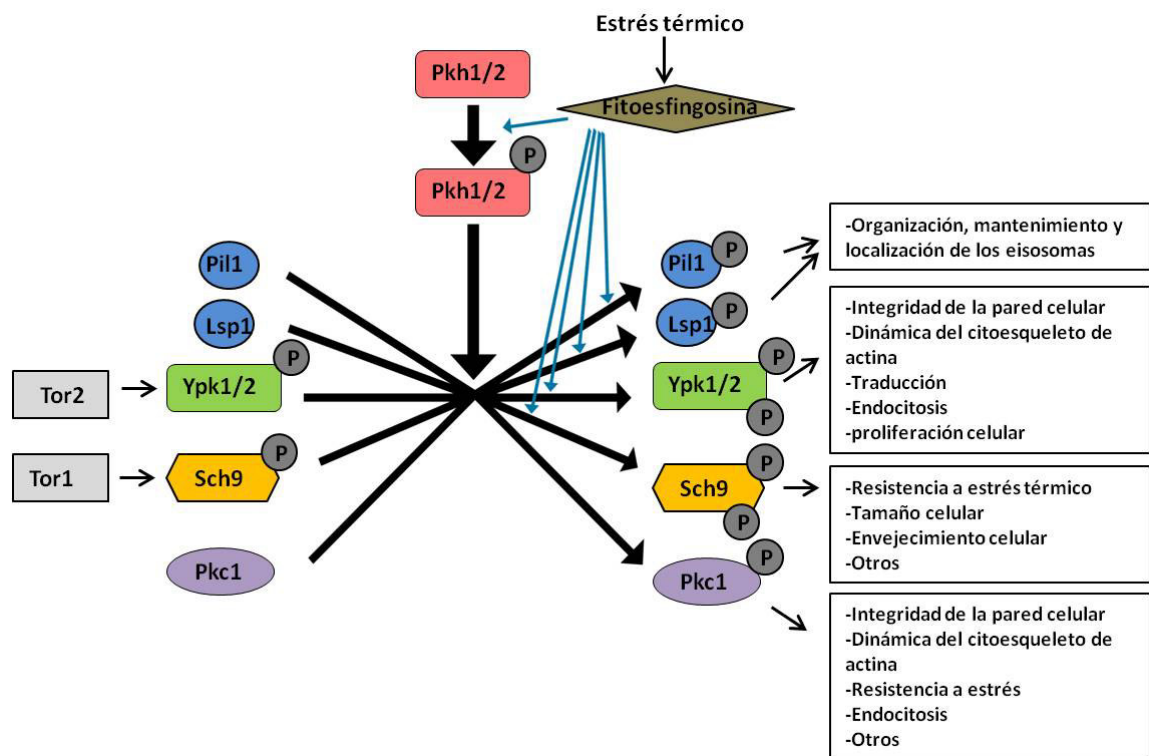


Figura 8: Ruta Pkh1/2. Adaptada de Dickson *et al.*, 2006.

Otros sustratos de Pkh1/2 son Pil1 y Lsp1, que forman complejos con estas quinasas (Gruhler *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2008) y son fosforilados *in vitro* por ellas, en un proceso regulado por fosfoinosítidos (Zhang *et al.*, 2004). Pil1 y Lsp1 son proteínas necesarias para una correcta

endocitosis ya que ambas contribuyen a la organización, mantenimiento y localización de los eisosomas (Young *et al.*, 2002; Walther *et al.*, 2006). Por otro lado, estas proteínas han sido propuestas como inhibidores de esta ruta ya que su delección provoca hiperactivación de Slt2 y disminuye la resistencia a un choque térmico (Zhang *et al.*, 2004). También se ha descrito que Pkh1/2 fosforila Sch9 (Figura 8) y esta fosforilación es dependiente y está favorecida por fitoesfingosina de manera similar a lo que ocurre con Ypk1/2 (Liu *et al.*, 2005).

3.3. Citoquinesis y anillo de septinas

S. cerevisiae se divide asimétricamente en cada ciclo como resultado de la constricción del anillo de actomiosina y la formación del septo primario. Estos dos procesos están interconectados ya que la constricción del anillo está implicada en la correcta internalización de la membrana plasmática para la formación del septo primario, el cual a su vez, estabiliza el anillo de actomiosina. Tras establecerse el sitio específico de división, contraerse el anillo de actomiosina y formarse el septo primario constituido principalmente por quitina, dos septos secundarios formados principalmente por glucano y manoproteínas se sintetizan a ambos lados del septo primario. La degradación del septo primario y parte de los secundarios por la acción de quitinasas y glucanasas permite la división celular (Wloka y Bi, 2012).

La GTPasa Rho1 participa en la citoquinesis a través de dos vías separadas. Por un lado, mediando el ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina durante la anafase, de manera dependiente de Tus1 (Yoshida *et al.*, 2006). En la fosforilación de Tus1 participa tanto el complejo Cdc28/Cdk1 como Cdc5 (Kono *et al.*, 2008). Por otro lado, esta GTPasa participa en la citoquinesis regulando la formación del septo después de la mitosis debido a la interacción con el PtdIns-4,5P₂, enriquecido en el cuello de la yema (Yoshida *et al.*, 2009). Esta función de Rho1 es dependiente de Rom2 ya que esta GEF de Rho1 no se recluta al cuello hasta después de la mitosis (Yoshida *et al.*, 2006) y se concentra en sitios donde se acumula el PtdIns-4,5P₂ (Audhya y Emr, 2002).

El anillo de septinas ha sido recientemente reconocido como un componente del citoesqueleto ya que, además de formar filamentos, se asocia con membranas celulares, filamentos de actina y microtúbulos (Mostowy y Cossart, 2012). Las septinas juegan un papel fundamental en la citoquinesis mediante la formación de un anillo en el cuello entre la célula madre y la célula hija, que representa un plano de división entre dos dominios definidos. Este anillo actúa como barrera de difusión y establece un compartimiento específico en el cuello,

donde se concentran factores difusibles importantes para la citoquinesis como la proteína del “polarisoma” Spa2, las quitín sintetas Chs2 y Csh3 o la proteína del exocisto Sec3 (Barral *et al.*, 2000; Roh *et al.*, 2002). Por otro lado, las septinas funcionan como organizadores corticales del citoesqueleto de actina y los microtúbulos, reclutando proteínas al anillo del cuello (Barral y Kinoshita, 2008; Gilden y Krummel, 2010; Gladfelter, 2010). Así desempeñan un papel esencial en el posicionamiento del anillo de actomiosina (Longtine y Bi, 2003; Dobbelaere y Barral, 2004) y el huso mitótico (Kusch *et al.*, 2002; Grava *et al.*, 2006; Merlini y Piatti, 2011), en la selección del sitio de gemación (Halme *et al.*, 1996; Roemer *et al.*, 1996; Sanders y Herskowitz, 1996) y en el crecimiento polarizado (Barral *et al.*, 1999; Longtine *et al.*, 2000). Además, las septinas también han sido implicadas en el establecimiento y mantenimiento de la asimetría durante la morfogénesis celular contribuyendo a la división del contenido celular (McMurray y Thorner, 2009), en el control del ciclo celular, en la coordinación de la respuesta a daño en el DNA y en el denominado “*checkpoint*” de morfogénesis (McMurray *et al.*, 2011).

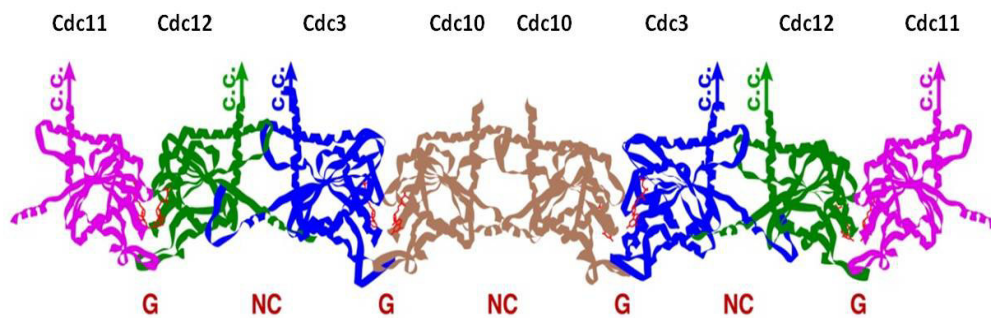


Figura 9: Distribución de las septinas en el heterotetrámero. G indica una interacción entre las septinas por un residuo adyacente al dominio GTP y NC una interacción por los extremos amino y carboxi-terminal. Adaptada de McMurray *et al.*, 2011.

Las septinas son proteínas de unión a GTP altamente conservadas en eucariotas superiores, capaces de ensamblarse en heteroligómeros y estructuras ordenadas como filamentos y anillos (Bertín *et al.*, 2008). En *S. cerevisiae* fueron identificadas al estudiar genes reguladores del ciclo celular (CDC), y están codificadas por los genes *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12* y *SHS1/SEP7* durante el crecimiento vegetativo (Longtine *et al.*, 1996; McMurray y Thorner, 2009; Oh y Bi, 2011). Mutaciones en estos genes provocan defectos en citoquinesis (Hartwell, 1971) aunque las células siguen gemando, sintetizando el DNA y dividiendo el núcleo. Las cinco septinas mitóticas forman un heterotetrámero compuesto por una molécula de cada una de las septinas, en este orden: Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10, donde Cdc3 y Cdc12 son esenciales, ya que sin ellas no se formaría el núcleo del complejo, ni tendría lugar la polimerización (Versele *et al.*, 2004) (Figura 9). Dos de estos heterotetrámeros se asocian a su

vez a través de Cdc10, dando lugar al octámero no polar Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11, que es la unidad básica de polimerización de los filamentos (Bertín *et al.*, 2008). Los filamentos de septinas son resultado de la unión de varios octámeros a través de la subunidad Cdc11. Existe otra septina, Shs1, que ocupa alternativamente la posición de Cdc11, pero que, a diferencia de Cdc11, no es esencial. Sin embargo, en ensayos *in vitro* en los que Shs1 sustituye a Cdc11 en el extremo de los octámeros, éstos no se ensamblan en forma de filamentos, sino que se asocian lateralmente en racimos curvados que forman anillos. Además si esta septina falta *in vivo*, los filamentos formados por las otras septinas están desorganizados, lo que indica que tiene un papel en el ensamblaje correcto del anillo (García *et al.*, 2011). Durante la esporulación, Cdc12 y Shs1 son sustituidas por Spr3 y Spr28 (De Virgilio *et al.*, 1996; Fares *et al.*, 1996).

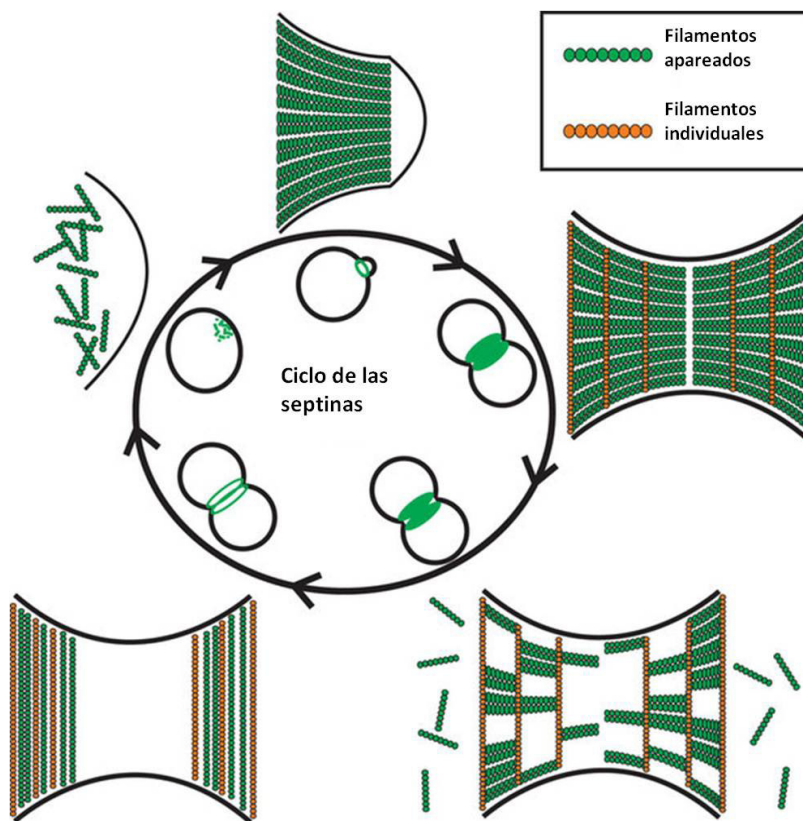


Figura 10: Modelo de la distribución y dinámica de remodelamiento de las septinas durante el ciclo celular. Imagen tomada de Ong *et al.*, 2014.

La formación de un anillo cortical de septinas en el inicio de la gemación es un proceso controlado por la GTPasa Cdc42 al finalizar la fase G1 y comenzar un nuevo ciclo celular (Cid *et al.*, 2001; Iwase *et al.*, 2006). Tras la emergencia de la yema, el anillo de septinas se expande en forma de reloj de arena en el cuello entre la célula madre e hija formando un collar. Este anillo está formado por filamentos dobles apareados que se disponen de manera coaxial al eje madre-

hija (Figura 10 y 11). Durante la citoquinesis el anillo de septinas se divide en dos anillos corticales formados por filamentos individuales perpendiculares al eje madre hija (Ong *et al.*, 2014). Entre el doble anillo de septinas se intercala el anillo de actomiosina (Cid *et al.*, 2001; Lippincott *et al.*, 2001). La transición desde la estructura en forma de reloj de arena o collar al doble anillo viene acompañada de cambios en la orientación de los filamentos de septinas (Vrabioiu y Mitchison, 2007; McMurray y Thorner, 2009; DeMay *et al.*, 2010).

Las septinas sufren una serie de modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, SUMOilaciones y acetilaciones que tienen importantes efectos en su ensamblaje y en sus funciones (Hernández-Rodríguez y Momany, 2012). La adición de SUMO (*Small Ubiquitin-related MODifier*) a las septinas Cdc3, Cdc11 y Shs1 promueve el desensamblaje de los anillos tras la citoquinesis (Johnson y Blobel, 1999; Takahashi *et al.*, 1999). Se ha demostrado que Cdc3, Cdc10, Cdc12 y Shs1 se acetilan para regular la transición de anillo a collar y la localización de los anillos de septinas (Mitchell *et al.*, 2011). La modificación más abundante y mejor caracterizada de las septinas es la fosforilación, y mutaciones que afectan a los sitios de fosforilación producen defectos en morfogénesis y citoquinesis (Hernández-Rodríguez y Momany, 2012). Al menos cinco proteínas quinasas desempeñan un papel importante en la regulación de las septinas (Figura 11). Cla4, un miembro de la familia de las quinasas PAK que se unen a Cdc42, junto con Gin4, participa en el inicio de la formación de los filamentos de septinas y en la estabilización de los mismos (Versele y Thorner, 2005). Cla4 interacciona con las septinas y fosforila *in vivo* a Cdc3, Cdc10, Cdc11 y en menor medida a Cdc12, y a Cdc3 y Cdc10 *in vitro* (Versele y Thorner, 2004). La fosforilación de Cdc10 por Cla4, presumiblemente al final de la fase G1, parece desempeñar un papel clave en la estabilización de los filamentos de septinas (Holly y Blumer, 1999). La proteína quinasa Gin4 se localiza en el cuello de las células y se piensa que regula la división del collar de septinas en dos anillos, fosforilando al menos a Shs1 (Longtine *et al.*, 1998; Dobbelaere *et al.*, 2003). Por otro lado se ha demostrado que la quinasa Elm1 fosforila *in vitro* a Bni5, una proteína encargada de reclutar miosina al cuello de la yema por medio de interacciones directas con las septinas. Se cree que esta fosforilación también regula la transición de las septinas de la estructura en forma de collar a la de los dobles anillos (McMurray y Thorner, 2009; Patasi *et al.*, 2015). La fosforilación de Shs1 por las quinasas Cdk (Ciclin-Dependent Kinases) Cdc28 y Pho85 puede provocar el ensamblaje de las septinas para formar el anillo y marcar el sitio de gemación (Mortensen *et al.*, 2002; Egelhofer *et al.*, 2008), mientras que la fosforilación de las septinas Cdc3 por parte de Cdc28 también puede promover el desensamblaje del anillo tras la citoquinesis y marca a las septinas para su degradación (Tang y Reed, 2002). Por otro lado, la

fosfatasa PP2A unida a su subunidad reguladora Rts1, está implicada en la desfosforilación de la septina Shs1 para promover el desensamblaje del anillo después de la citocinesis (Dobbelaere *et al.*, 2003).

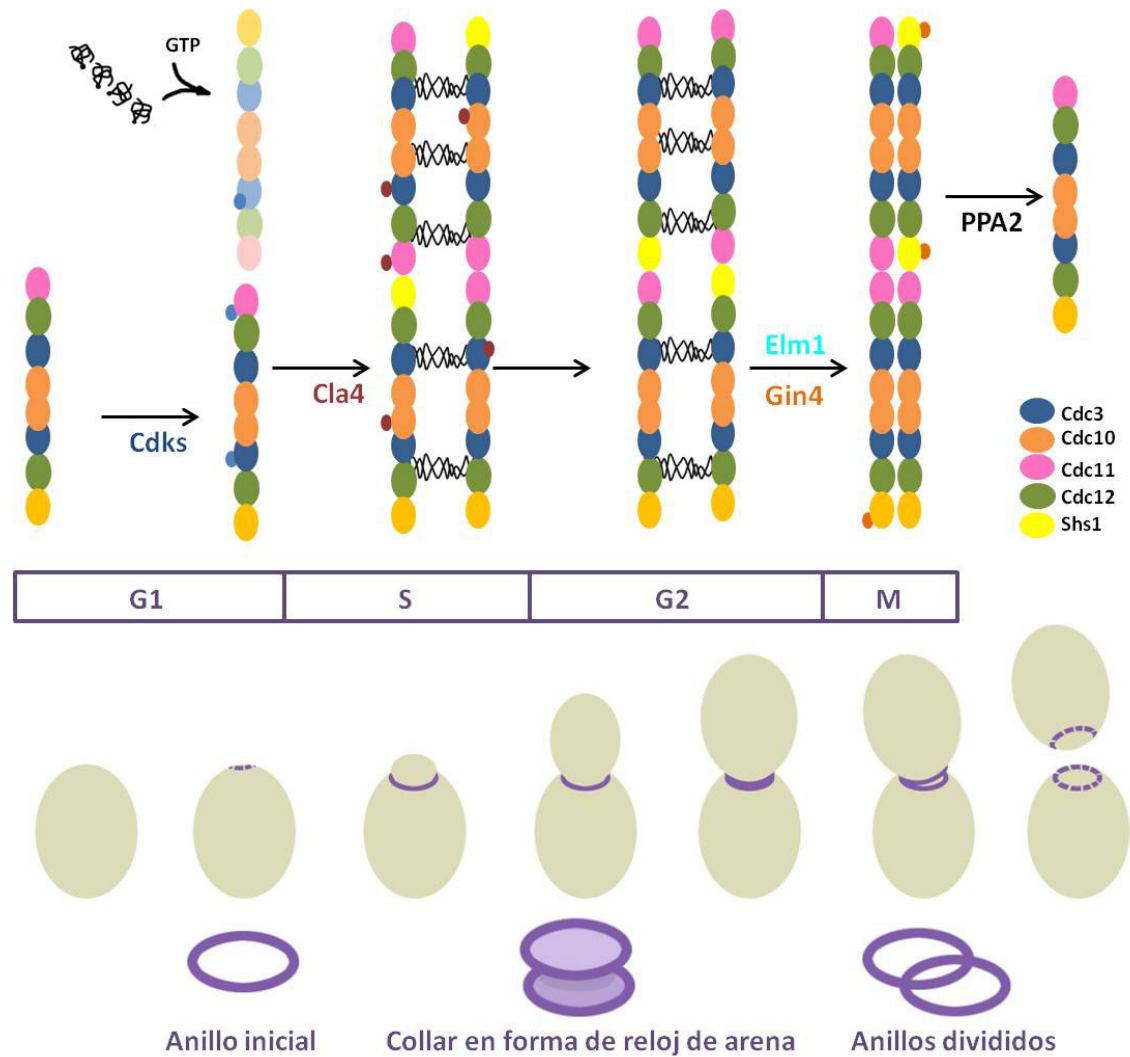


Figura 11: Organización del anillo de septinas y sus modificaciones por fosforilación durante el ciclo celular. Adaptada de McMurray y Thorner. 2009.

En relación a la ruta CWI se ha demostrado que Rho1 y Pkc1 contribuyen al ensamblaje del anillo de septinas por medio de la fosforilación de Syp1, proteína asociada a la membrana plasmática que colocaliza con las septinas en el cuello de la yema, aunque de forma parcialmente independiente del módulo de MAPks (Merlini *et al.*, 2015). Además, se ha observado que el estrés del retículo endoplásmico (ER), a través de la ruta ERSU (*ER Stress Surveillance*), activa Slt2 y altera el anillo de septinas para retrasar la herencia del ER de la célula madre a la hija y la citocinesis (Babour *et al.*, 2010).

3.4. Fosfoinosítidos

Los fosfoinosítidos son componentes fundamentales de la membrana plasmática en células eucarióticas implicados en la transducción de señales intracelular, ya que actúan como segundos mensajeros lipídicos regulando GTPasas pequeñas. Además participan en la polimerización del citoesqueleto de actina controlando el tráfico de membranas. Estos procesos de transmisión de señales y de tráfico ocurren de manera específica en determinados orgánulos debido a que cada fosfoinosítido presenta una distribución subcelular particular, confiriendo identidad a un orgánulo (van den Bout y Divecha, 2009; Mayinger, 2012).

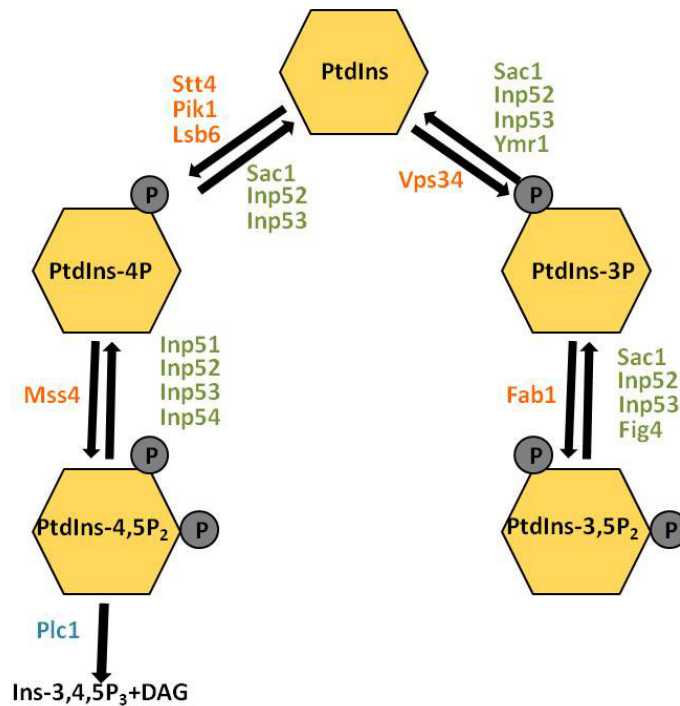


Figura 12: Fosfoinosítidos presentes en *S.cerevisiae*. Se indican las enzimas responsables de la síntesis (en naranja) y de la degradación (en verde) de cada uno de ellos. La fosfolipasa C (Plc1), responsable de degradar PtdIns-4,5P₂ en Inositol 3,4,5 trifosfato (Ins-3,4,5P₃) y Diacilglicerol (DAG), aparece en azul. Adaptada de Strahl y Thorner (2007).

Los fosfoinosítidos se generan a partir del fosfatidilinositol (PtdIns), resultado de la unión de un anillo de inositol que contiene en posición 1' un grupo fosfato y una molécula de glicerol esterificada con dos cadenas de ácidos grasos que anclan la molécula a las bicapas lipídicas. En la mayoría de las células eucarióticas, el PtdIns es fosforilado en el anillo de inositol expuesto al lumen intracelular en las posiciones 2, 3, 4 y 5, para dar lugar a siete posibles especies de fosfoinosítidos (Di Paolo y De Camilli, 2006). Estos fosfoinosítidos pueden convertirse unos en otros por la actuación de quinasas y fosfatasaes específicas que actúan regulando de manera precisa los niveles de estos mensajeros lipídicos para la homeostasis celular, y cuya localización

está a su vez controlada con este propósito (McCrea y De Camilli, 2009). La distribución de estos fosfoinosítidos y su contribución a las funciones celulares está conservada en *S. cerevisiae*, aunque solo existen cinco, de las siete especies de fosfoinosítidos. En la Figura 12 se muestra los fosfoinosítidos presentes en levadura y las enzimas encargadas de su regulación.

Para ejercer sus funciones, los fosfoinosítidos se unen a módulos de aminoácidos básicos de sus efectores mediante interacciones electrostáticas. Estos módulos o dominios se encuentran en numerosas proteínas y reciben un nombre dependiendo de sus características y su especificidad por el fosfoinosítido (Lemmon, 2008; Moravcevic *et al.*, 2012). El primer módulo de interacción con fosfoinosítidos que se identificó fue el dominio PH (*Pleckstrin homology*), que se une a PtdIns-4,5P₂ (Harlan *et al.*, 1994). Actualmente se conocen 11 módulos que interaccionan con fosfoinosítidos con una afinidad variable (Kutateladze, 2010).

De entre todos los fosfoinosítidos presentes en *S. cerevisiae*, el PtdIns-4,5P₂ es el más importante ya que participa en la regulación de numerosos procesos celulares claves en la biología y la señalización celular. Las funciones ejercidas por el PtdIns-4,5P₂ en la célula de levadura se han determinado a partir de los estudios realizados con mutantes en el gen *MSS4* que expresan versiones termosensibles de esta PtdIns-4P 5-quinasa implicada en la conversión de PtdIns-4P a PtdIns-4,5P₂ (Desrivieres *et al.*, 1998) (Figura 12). Se ha establecido una relación directa en la regulación que ejerce este segundo mensajero sobre la organización del citoesqueleto de actina (Desrivieres *et al.*, 1998; Homma *et al.*, 1998; Audhya *et al.*, 2004) ya que, igual que ocurre en eucariotas superiores, muchas de las proteínas relacionadas funcionalmente con Mss4 son proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina, como Cap1, Cap2 o Slm1, o de la polaridad celular, como Spa2, Bem4 y Myo5 (Audhya *et al.*, 2004). Esto contribuye de forma determinante a la formación de parches de actina en los sitios de endocitosis. Además los fosfoinosítidos interaccionan con las septinas en el cuello de la yema, lo que conlleva el reclutamiento y enriquecimiento de lípidos en esta zona y se piensa que esta interacción puede jugar un importante papel en la polimerización del anillo de septinas (Bertín *et al.*, 2010).

La presencia de PtdIns-4,5P₂ también resulta determinante para marcar la polaridad celular en *S. cerevisiae*. El anclaje de las vesículas secretoras a los sitios de polaridad está promovido por la interacción de los componentes del exocisto Sec3 y Exo70 con este fosfoinosítido (He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). También se ha descrito su participación como determinante de

polaridad en los procesos de señalización que tienen lugar en el apareamiento (Garrenton *et al.*, 2010).

Otra de las funciones en las que interviene el PtdIns-4,5P₂ en las células de levadura, al igual que sucede en eucariotas superiores, es en la endocitosis mediada por clatrina. Por un lado se ha descrito que la proteína Arf3 modula los niveles de este fosfoinosítido para facilitar el proceso endocítico (Smaczynska-de *et al.*, 2008) y por otro, hay varias proteínas de la maquinaria endocítica que contienen dominios amino terminales ENTH/ANTH por los que se unen al PtdIns-4,5P₂ (Aguilar *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). PtdIns-4,5P₂ es el responsable del reclutamiento de estas proteínas a membranas, por lo que sus funciones se ven comprometidas cuando se anulan estas interacciones. Por último, existen estudios que demuestran que los niveles de este mensajero en la membrana plasmática son determinantes para el proceso de internalización y escisión de la vesícula (Sun *et al.*, 2007) ya que la eliminación del PtdIns-4,5P₂ de las membranas por las PtdIns-5 fosfatasas favorece la disociación de los factores y proteínas adaptadoras de la endocitosis (Stefan *et al.*, 2005).

En cuanto a la relación entre PtdIns-4,5P₂ y la ruta CWI, se ha descrito que los dominios PH de la GEF Rom2 son importantes para la activación de Rho1 (Bickle *et al.*, 1998) y que estos fosfoinosítidos son necesarios para la fosforilación de Slt2 en presencia de estrés térmico. Además, se ha observado que la localización de Rom2 en sitios de crecimiento polarizado es debida a la interacción con PtdIns-4,5P₂ (Audhya y Emr, 2002). Sin embargo no está muy claro el papel que juega esta interacción en la activación de la ruta CWI, ya que un incremento en los niveles de PtdIns-4,5P₂ suprime la sensibilidad a temperatura de un mutante *rom2Δ* (Stolz *et al.*, 1998) y un mutante *rom2* carente de los dominios PH presenta activada la ruta (Lorberg *et al.*, 2001). De acuerdo a esto, la activación de la ruta CWI es principalmente dependiente de los niveles de PtdIns-4,5P₂ y la interacción de este fosfoinosítido con Rom2 es importante pero no esencial para la correcta activación de la ruta. En esta misma línea, en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, se observó que la eliminación de PtdIns-4,5P₂, mediante su conversión a PtdIns-3,4,5P₃, desencadena una activación persistente de la ruta CWI dependiente de Wsc1 y Rom2 y una respuesta transcripcional típica de estrés de pared celular (Fernández-Acero *et al.*, 2015).

Es importante señalar también el papel del PtdIns-4P de la membrana plasmática en la señalización celular en levaduras. Las primeras evidencias se basaron en el rescate por

sobreexpresión de Pkc1 del fenotipo de sensibilidad a estaurosporina que presenta un mutante *stt4* (Yoshida *et al.*, 1994). El hallazgo de interacciones genéticas entre Stt4 y diversos componentes de la ruta CWI confirmó su papel en la señalización mediada a través de Pkc1 (Audhya y Emr, 2002).

3.5. Tráfico intracelular de membranas

La endocitosis es un proceso mediante el cual las células eucarióticas adquieren nutrientes, regulan las respuestas a estímulos externos y mantienen la composición de la membrana plasmática. En el mecanismo endocítico, los componentes de la membrana plasmática, así como del medio extracelular, son englobados en una invaginación de la membrana dando lugar a vesículas citoplasmáticas. Para la formación de estas vesículas es necesario que el contenido a transportar sea englobado en una cubierta de proteínas. Estas proteínas también controlan la incorporación selectiva de los cargos mediante la interacción con dominios específicos que quedan expuestos en las membranas donadoras (Yu y Hughson, 2010).

En eucariotas superiores se han descrito numerosas rutas endocíticas, sin embargo, la levadura *S. cerevisiae* solo lleva a cabo la endocitosis mediada por clatrina (*Clathrin-Mediated Endocytosis*, CME). Si bien recientemente se ha descrito una vía independiente que podría funcionar de forma residual cuando la endocitosis mediada por clatrina se encuentra bloqueada (Prosser *et al.*, 2011). En el sitio de endocitosis se produce la formación de parches de actina por medio de la llegada de diversas proteínas que regulan la actividad del complejo de nucleación de actina Arp2/3. Esta polimerización de actina es vital para el proceso de internalización endocítica ya que es responsable de generar la fuerza necesaria para la deformación de la membrana, la fisión de vesículas de la membrana plasmática y el movimiento de ésta hacia el interior celular (Kubler y Riezman, 1993; Geli y Riezman, 1996; Ayscough, 2000). Además, en el proceso endocítico, como se ha comentado en el anterior apartado, los fosfoinosítidos actúan como co-receptores en el reclutamiento y regulación de la maquinaria endocítica en la membrana plasmática (Aguilar *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005).

Una vez que ha tenido lugar la endocitosis, el material queda englobado en los endosomas tempranos (EE) desde donde se reciclan aquellas proteínas que deben volver de forma rápida a la membrana a través de endosomas de reciclaje (RE) (Figura 13). Los endosomas tempranos pueden intercambiar tanto anterograda como retrogradamente vesículas con el aparato de Golgi, por lo que se asume que estos endosomas son, además del punto de entrada

de las moléculas internalizadas, el primer punto de control de la ruta endocítica. Posteriormente los endosomas tempranos siguen su curso, maduran y se convierten en endosomas tardíos (LE). Éstos controlan el tráfico de cargos que deben ser reciclados pasando al *trans*-Golgi (TGN de *trans-Golgi Network*) vía el complejo retrómero, desde donde son secretados a través de la ruta exocítica para poder alcanzar de nuevo la membrana plasmática. Por otro lado, estos endosomas reciben cargos procedentes del *trans*-Golgi a través de la vía carboxipeptidasa (CPY). En los endosomas tardíos también se controla el tráfico a vacuola de proteínas sintetizadas de *ново*, esenciales para la función vacuolar o aquellas que van a ser degradadas en estos orgánulos por enzimas hidrolíticas, pasando previamente por los cuerpos multivesiculares (MVB). Existe también un transporte de cargos directamente desde el aparato de Golgi a las vacuolas y un intercambio dentro del aparato de Golgi y con el retículo endoplasmático (ER) (Sengupta y Linstedt, 2011) (Figura 13).

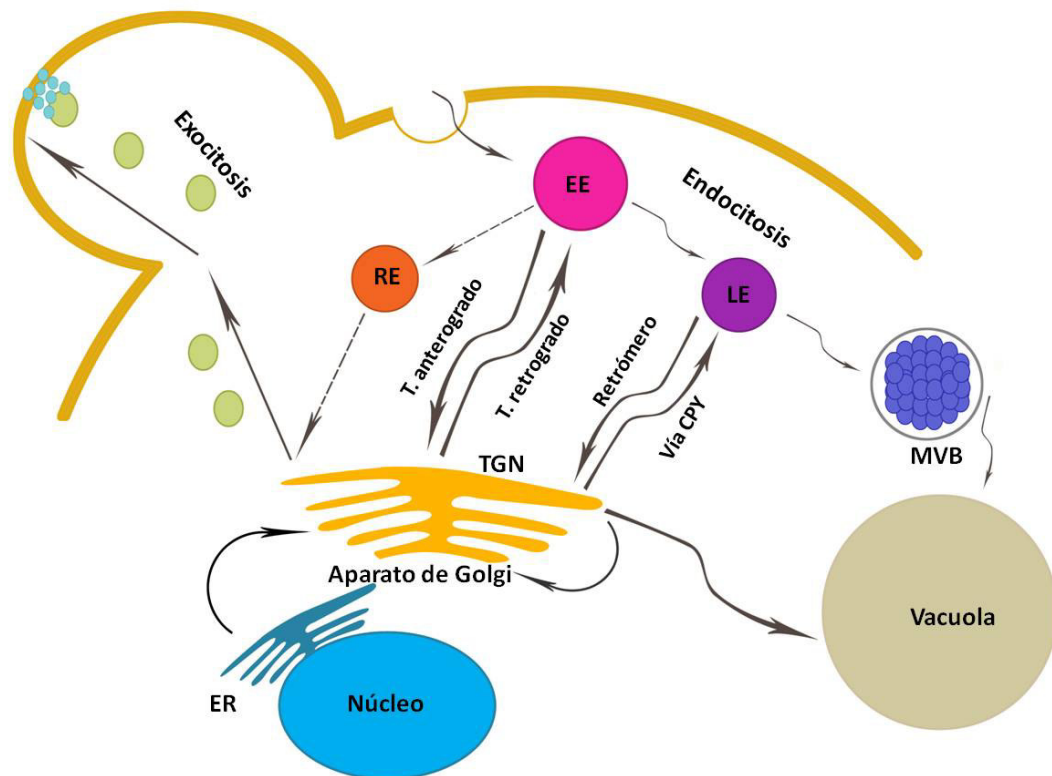


Figura 13: Representación esquemática de las principales rutas de tráfico endocítico y exocítico en *S. cerevisiae*. EE: endosomas tempranos, LE: endosomas tardíos, RE: endosomas de reciclaje, MVB: cuerpos multivesiculares, ER: retículo endoplásmico, TGN: *trans*-Golgi y CPY: carboxipeptidasa.

Por otro lado, la ruta secretora está constituida por una serie de orgánulos endomembranosos que funcionan secuencialmente para producir la secreción de proteínas al medio extracelular (Figura 13). Las proteínas sintetizadas de *ново* en el ribosoma se vierten al

lumen del ER donde se pliegan adecuadamente y pueden llegar a sufrir una primera modificación postraducciona. Posteriormente son trasladadas mediante transporte anterogrado al aparato de Golgi, donde pueden sufrir una segunda modificación postraducciona. Desde aquí las proteínas son destinadas bien a la membrana plasmática mediante esta ruta secretora o bien a los orgánulos membranosos de la ruta endocítica degradativa. Como hemos comentado anteriormente, existe un flujo de transporte de cargos que contienen proteínas propias de ER de manera retrograda desde el aparato de Golgi al ER, para que retornen a su sitio de origen. Como resultado final de la ruta secretora se produce la exocitosis polarizada mediante la cual, las vesículas secretoras transportadas a lo largo del citoesqueleto de actina, alcanzan determinadas zonas de la membrana plasmática, se anclan a ellas y se fusionan, liberando su contenido (Figura 13). La exocitosis es un proceso regulado temporalmente por el ciclo de división celular (He y Guo, 2009) y es esencial para una gran variedad de funciones celulares, tales como el crecimiento, la biosíntesis de la pared celular y la morfogénesis.

En todo este tráfico de membranas dentro de la célula participan GTPasas pequeñas de la familia Rab. Estas GTPasas están íntimamente relacionadas y a menudo reguladas por los fosfoinosítidos, que dotan de identidad a las diversas membranas celulares (Liu y Storrie, 2012; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012). Tanto los fosfoinosítidos como las GTPasas Rab son responsables de que la vesícula en tránsito sea reconocida por la membrana diana adecuada y se dirigida hacia el destino apropiado. Por último, es necesario el anclaje de las vesículas y la fusión de las membranas, proceso en el que participan una serie de proteínas que permiten el contacto inicial entre las dos membranas a fusionar y a su vez son efectores de las Rab GTPasas (Cai *et al.*, 2007; Yu y Hughson, 2010).

Existen evidencias de que Rho1 y Pkc1 están relacionadas con tráfico vesicular ya que, en presencia de un choque térmico, estas proteínas activadas participan en la salida de Chs3 desde el TGN (Valdivia y Schekman, 2003). Pkc1 también ha sido relacionada con el complejo endocítico AP-2 ya que interacciona con la subunidad Apm4 y la mutación en esta proteína del posible sitio de fosforilación por Pkc1 (T176), afecta al reclutamiento de este complejo a los sitios de endocitosis (Chapa y Ayscough, 2014). Además, en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación se ha demostrado que en ausencia de PtdIns-4,5P₂ y de manera dependiente del citoesqueleto de actina, Pkc1, junto con Wsc1, Rom2 y Rho1, se localiza en endosomas de reciclaje *post*-Golgi desde donde son capaz de activar la ruta CWI (Fernández-Acero *et al.*, 2015).

4. UTILIZACIÓN DE PROTEÍN QUINASAS SENSIBLES A ANÁLOGOS DE ATP COMO MÉTODO PARA SU ESTUDIO

Como ya hemos mencionado anteriormente, las MAPKs regulan una gran variedad de rutas de traducción de señales, pero el gran número de quinasas hace difícil precisar la función en señalización de cada una de ellas. La estrategia más común para identificar la función de una proteína consiste en eliminar el gen que la codifica y observar cuál es el efecto que esto provoca. También se pueden obtener quinasas catalíticamente inactivas con mutaciones puntuales en el sitio activo de unión a ATP. Pero algunas proteínas quinasas son esenciales para la viabilidad celular, lo que hace imposible su eliminación; por eso, se han diseñado versiones sensibles a la temperatura, de modo que la funcionalidad de la quinasa solo se ve afectada al cultivar los mutantes a temperaturas restrictivas. Por otro lado, se han realizado estudios de inhibición de su actividad por compuestos químicos. Esto permite realizar una inhibición reversible, aunque, en la gran mayoría de casos, los inhibidores que existen son poco selectivos, produciendo, por tanto, inhibición de otras quinasas y efectos no deseados (Klein *et al.*, 2011). Por ello, resulta de gran interés el desarrollo de estrategias alternativas que permitan inhibir una quinasa de manera selectiva, puntual y reversible. Recientemente se ha desarrollado un sistema para generar mutaciones genéticas en el bolsillo de unión al ATP de las proteínas quinasas que no afectan a su actividad catalítica, pero que las hace susceptibles a análogos voluminosos de ATP. Estos análogos pueden actuar como inhibidores específicos y reversibles de estas quinasas, por lo que el fenotipo observado al inhibirse la quinasa es exclusivamente debido a la disminución de su actividad (Zhang *et al.*, 2013) (Figura 14). Estas versiones modificadas de la quinasa se denominan quinasa-as (*analogue sensitive*).

Los inhibidores de proteínas quinasas son moléculas similares al ATP pero que carecen del fosfato, por lo que pueden unirse al bolsillo catalítico de las quinasas y bloquear la actividad enzimática de estas proteínas. Existen dos familias de inhibidores de quinasas, una basada en el anillo sintético de pirazolo [3,4-*d*] pirimidina (PP1), que inhibe las quinasas Lck y Fyn de la familia de tirosínquinasas Src (Liu *et al.*, 1999; Waltenberger *et al.*, 1999). La otra familia de inhibidores de quinasas está basada en el producto natural indolocarbazole (K252a) que inhibe la proteína quinasa C, proteína quinasa A, proteína quinasa dependiente de GMPcíclico, quinasa de miosina de cadena larga, tirosín quinasas de la familia Trk, quinasas de la familia Src, quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y quinasas dependientes de Ca²⁺/Calmodulina (CAMKs) (Tapley *et al.*, 1992; Omura *et al.*, 1995; Bishop *et al.*, 2000b). Las modificaciones químicas de estos inhibidores consisten en el aumento de su tamaño para que así solo actúen sobre las quinasas-as

modificadas en su bolsillo catalítico y no sobre las silvestres (Bishop *et al.*, 1998; Bishop y Shokat, 1999; Bishop *et al.*, 2000a; Bishop *et al.*, 2000b). Para generar las modificaciones químicas de estos inhibidores se debe conocer o poder predecir la orientación con la que interaccionan con la quinasa y esta posición debe ser fácilmente accesible para poder modificarla. Además deben ser moléculas pequeñas que puedan atravesar las membranas celulares y ser administradas en concentraciones variables para estudiar el efecto total o parcial de la eliminación de la actividad catalítica, sin afectar las interacciones con otras proteínas o la localización celular.

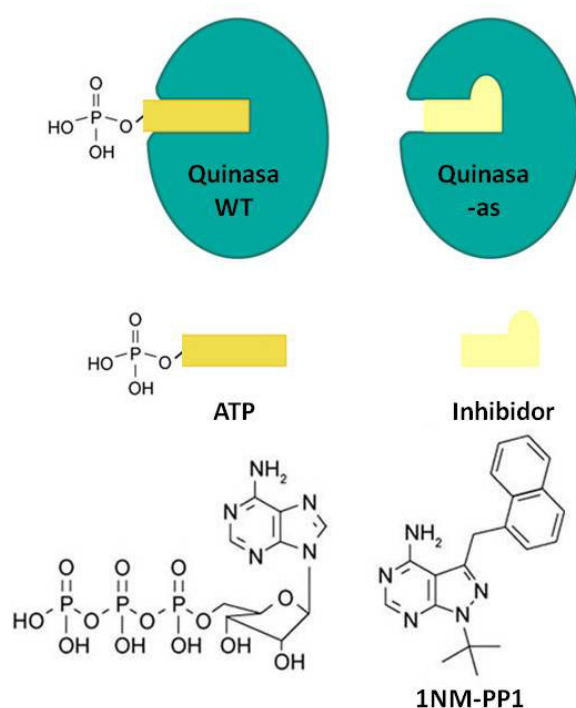


Figura 14: Inhibición reversible de quinasas sensibles a análogos de ATP. Adaptada de Koch y Hauf (2010).

Para obtener la versión de la quinasa-as se tiene que crear un hueco en su bolsillo de unión al ATP mediante la sustitución de un aminoácido de cadena larga por una glicina o alanina. Esto genera un nuevo bolsillo de unión al ATP más grande que el que presenta la versión silvestre, que permite albergar al análogo de ATP voluminoso (Figura 15). Esta mutación debe ser silenciosa funcionalmente y esta posición no debe estar ocupada por una alanina o glicina en otra quinasa, ya que la especificidad disminuiría. Idealmente, este residuo identificado para ser sensible al inhibidor, debe estar conservado en otras quinasas, para evitar un nuevo diseño (Bishop *et al.*, 2001). Es importante que estas modificaciones no afecten a la capacidad de la quinasa de unir ATP. En estudios *in vivo* esto no es un gran problema, debido a la gran cantidad de ATP existente en las células. También es importante descartar que el inhibidor actúe sobre la versión silvestre, por lo que es importante comparar siempre el fenotipo observado en la versión

sensible a análogos con el de la silvestre, en ausencia y presencia del inhibidor. Para analizar la inhibición *in vivo* de una quinasa es necesario trabajar con mutantes que carezcan de la versión silvestre, generar un mutante sensible al inhibidor y encontrar un sistema de expresión adecuado. En levaduras, el gen silvestre es directamente remplazado por el alelo sensible a la droga. En mamíferos, se puede silenciar la versión silvestre utilizando RNA de interferencia de doble cadena (Clemens *et al.*, 2000).

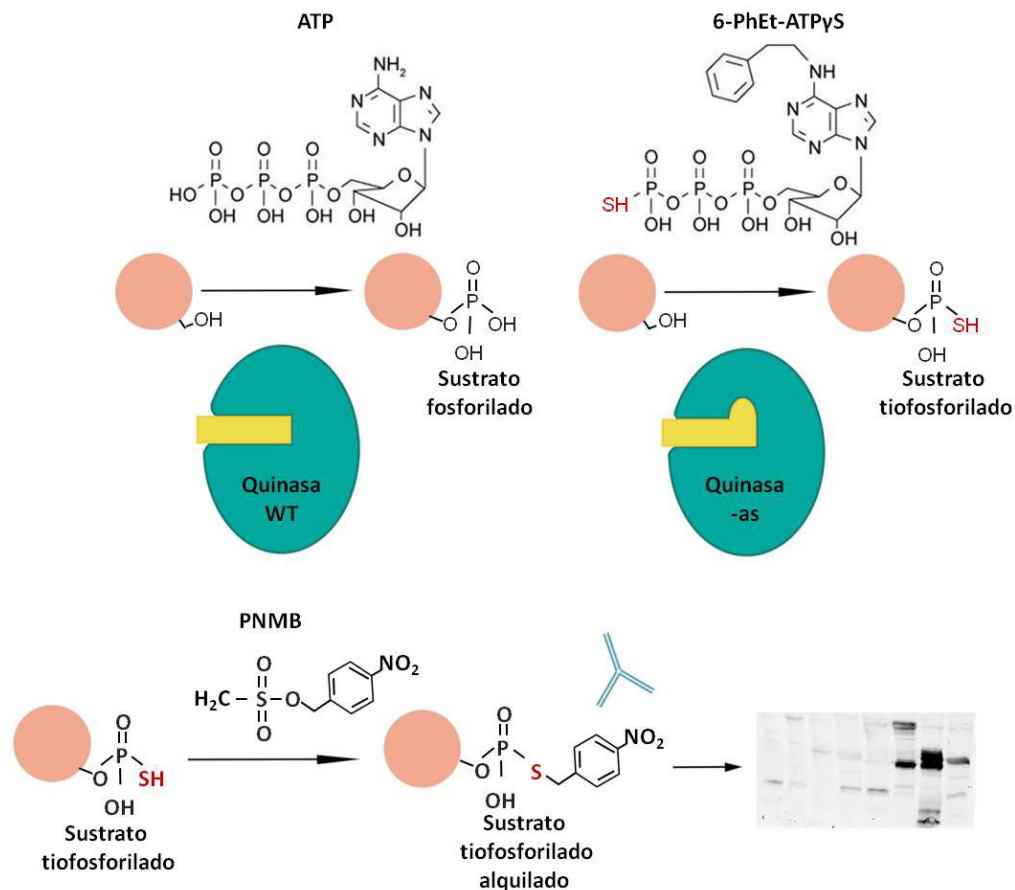
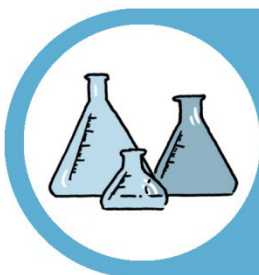


Figura 15: Representación esquemática de un ensayo quinasa *in vitro*. La quinasa sensible a análogos tiofosforila sustratos utilizando N⁶-(2feniletil)-adenosina-5'-O-(3-tiotrifosfato) (PhEt-ATPyS). Estos sustratos tiofosforilados son posteriormente identificados mediante *Western blotting*, tras sufrir una reacción de alquilación con p-nitrobencil mesilato (PNMB), con anticuerpos que reconocen específicamente el enlace éster tiofosfato. Adaptada de Hertz *et al.* (2010).

En *S. cerevisiae* se ha utilizado esta estrategia para el análisis funcional de algunas quinasas *in vivo*. Bishop y colaboradores (2000b) generaron una versión sensible a análogos de ATP de la MAPK Fus3, responsable de la vía de apareamiento, capaz de complementar la delección de esta quinasa. También ha servido para ampliar lo que ya se conocía sobre el papel de Cdc28 y Cla4 en la gemación y progresión del ciclo celular (Bishop *et al.*, 2000b). Asimismo, ha permitido estudiar el papel que desempeña la actividad catalítica de Hog1 en distintas funciones

y el entrecruzamiento de esta ruta con la de crecimiento filamentoso o la de respuesta a feromonas (Westfall y Thorner, 2006).

Estas versiones quinasa-as también acomodan análogos voluminosos de ATP γ S que tienen sustituido el fosfato de la posición gamma por un grupo tiofosfato. Estos análogos no son reconocidos por otras quinasa silvestres y de este modo, solo las quinasa modificadas, mediante ensayos quinasa *in vitro*, son capaces de transferir el grupo tiofosfato a sus dianas, generando proteínas tiofosforiladas de manera selectiva (Bishop *et al.*, 2000b). Las proteínas tiofosforiladas pueden ser posteriormente identificadas por *Western blotting*, tras realizar una reacción de alquilación, utilizando anticuerpos específicos que reconocen el enlace éster tiofosfato (Hertz *et al.*, 2010) (Figura 15). Esta estrategia puede usarse para confirmar una fosforilación directa sobre un sustrato potencial o para identificar nuevas dianas de estas quinasa modificadas utilizando técnicas de espectrometría de masas (Koch y Hauf, 2010). En *S. cerevisiae* se ha utilizado para identificar sustratos directos de la quinasa específica de meiosis Mek1 (Lo y Hollingsworth, 2011).



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación está centrado en el estudio de la ruta de integridad celular (CWI) de *S. cerevisiae*. Con el objetivo de disponer de nuevas herramientas para el estudio de esta ruta, previamente a este trabajo se desarrolló una versión de Slt2 (*slt2-as*) cuya modificación permite que esta MAPK acepte análogos voluminosos de ATP que pueden funcionar como inhibidores de su actividad catalítica de manera selectiva y reversible. Además, es también capaz de acomodar en su centro activo análogos de ATP que tienen sustituido el Y-fosfato del ATP por tiofosfato y transferir dicho grupo a sus sustratos en ensayos de actividad quinasa.

Por otro lado, para identificar nuevos estímulos y componentes reguladores de esta ruta, es muy útil reconfigurar las vías de traducción de señales mediante estrategias de biología sintética. El hecho de que una activación excesiva de la ruta CWI sea deletérea para la levadura, ha permitido diseñar un circuito genético de retroalimentación positiva que conduce a una amplificación continua de la señal transmitida por la ruta, que resulta letal mientras dura el estímulo (*IPAC: Circuit Amplification Pathway Integrity*). Esto convierte a las células que portan este circuito en hipersensibles a la estimulación de la ruta CWI.

Con estos antecedentes, los objetivos que nos planteamos en este trabajo son:

1. Caracterización de la versión de Slt2 sensible a análogos de ATP (*slt2-as*).
 - 1.1. Utilización de esta versión de Slt2 para estudiar el efecto de la inhibición de esta MAPK en mutantes sintéticos letales con *slt2Δ*.
 - 1.2. Identificación de nuevos sustratos de Slt2 mediante la utilización de esta versión en ensayos quinasa *in vitro*.
2. Caracterización del circuito de amplificación de la señal de la ruta CWI de *S. cerevisiae* (IPAC).
 - 2.1. Utilización del circuito IPAC en el rastreo de nuevos compuestos activadores de la ruta CWI.
 - 2.2. Identificación de nuevos componentes reguladores de la ruta CWI mediante el uso del circuito IPAC.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo se detallan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Relación de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo, genotipo y procedencia.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	<i>MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf, Alemania (Y00000)
Y00993	Isogénica BY4741; <i>slt2::kanMX4</i>	Euroscarf
Y02739	Isogénica BY4741; <i>rlm1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06672	Isogénica BY4741; <i>wsc1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06672	Isogénica BY4741; <i>mid2::kanMX4</i>	Euroscarf
Y07373	Isogénica BY4741; <i>msg5::kanMX4</i>	Euroscarf
Y02724	Isogénica BY4741; <i>hog1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y03340	Isogénica BY4741; <i>ste50::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05494	Isogénica BY4741; <i>opy2::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01328	Isogénica BY4741; <i>bck1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01736	Isogénica BY4741; <i>psk2::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01561	Isogénica BY4741; <i>ssk1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05405	Isogénica BY4741; <i>alg12::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05416	Isogénica BY4741; <i>coq2::kanMX4</i>	Euroscarf
Y04911	Isogénica BY4741; <i>msn4::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05642	Isogénica BY4741; <i>bud27::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01771	Isogénica BY4741; <i>rex4::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06896	Isogénica BY4741; <i>mog1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01242	Isogénica BY4741; <i>mnn11::kanMX4</i>	Euroscarf
Y02070	Isogénica BY4741; <i>cti6::kanMX4</i>	Euroscarf
Y02293	Isogénica BY4741; <i>flx1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y04337	Isogénica BY4741; <i>lpp1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y02266	Isogénica BY4741; <i>pfk26::kanMX4</i>	Euroscarf
Y03385	Isogénica BY4741; <i>isw1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y02690	Isogénica BY4741; <i>sic1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05428	Isogénica BY4741; <i>sut2::kanMX4</i>	Euroscarf
Y03566	Isogénica BY4741; <i>ume6::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05016	Isogénica BY4741; <i>tpk3::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01894	Isogénica BY4741; <i>ssf1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y04889	Isogénica BY4741; <i>nub1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06116	Isogénica BY4741; <i>sho1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01736	Isogénica BY4741; <i>psk2::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05798	Isogénica BY4741; <i>ptc6::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06201	Isogénica BY4741; <i>avo2::kanMX4</i>	Euroscarf
Y05459	Isogénica BY4741; <i>tip41::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01593	Isogénica BY4741; <i>tim18::kanMX4</i>	Euroscarf
Y07182	Isogénica BY4741; <i>snt1::kanMX4</i>	Euroscarf

Y01488	Isogénica BY4741; <i>fyv10::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04561	Isogénica BY4741; <i>hos2::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06899	Isogénica BY4741; <i>csn2::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01343	Isogénica BY4741; <i>scp160::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02011	Isogénica BY4741; <i>psy2::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y00513	Isogénica BY4741; <i>cmp2::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y07316	Isogénica BY4741; <i>srv2::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02281	Isogénica BY4741; <i>pog1::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04256	Isogénica BY4741; <i>hkr1::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01440	Isogénica BY4741; <i>syg1::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04311	Isogénica BY4741; <i>snf1::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06152	Isogénica BY4741; <i>bem2::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06146	Isogénica BY4741; <i>pea2::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04010	Isogénica BY4741; <i>pph3::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y07045	Isogénica BY4741; <i>sap190::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02129	Isogénica BY4741; <i>rny1::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02779	Isogénica BY4741; <i>rts1::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y05149	Isogénica BY4741; <i>vps34::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y05009	Isogénica BY4741; <i>rcn1::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01936	Isogénica BY4741; <i>gga2::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y03774	Isogénica BY4741; <i>vps39::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
1783	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-1 his4 KanMX4</i>	Lee et al., 1993
DL454	Isogénica 1783; <i>mpk1Δ::TRP1</i>	Lee et al., 1993
DBY746	<i>MATa trp1-289 leu2-3,112 ura3-52 his3Δ1</i>	Torres et al., 1991
DBY746DK	Isogénica DBY746; <i>slt2::URA3</i>	Torres et al., 1991
Y3656	<i>MATα; can1Δ::MFA1pr-HIS3- MFA1pr-LEU2; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0; lys2Δ0</i>	Schuldiner et al., 2005
YSTH1	Isogénica Y3656, <i>HO::natMX4::HO</i>	Martín et al., 2015
YSTH2	Isogénica Y3656; <i>HO::MLP1p-MKK1^{S386P}-ADHt-natMX4::HO</i>	Dr. Humberto Martín
YSTH4	Isogénica Y3656; <i>slt2:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH5	Isogénica Y3656; <i>wsc1:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH6	Isogénica YSTH1; <i>mid2:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH3	Isogénica Y3656; <i>rom2:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH7	Isogénica Y3656; <i>pkc1^{DAmP}</i>	Martín et al., 2015
YSTH8	Isogénica Y3656; <i>bck1:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH9	Isogénica Y3656; <i>mkk1:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH10	Isogénica Y3656; <i>mkk2:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH11	Isogénica Y3656; <i>rlm1:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH12	Isogénica Y3656; <i>swi4:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH13	Isogénica Y3656; <i>swi6:: natMX4</i>	Martín et al., 2015
YSTH14	Isogénica Y3656; <i>msg5:: natMX4</i>	Martín et al., 2015

YSTH15	Isogénica Y3656; <i>nbp2::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH16	Isogénica Y3656; <i>ptc1::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH17	Isogénica Y3656; <i>hog1::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH18	Isogénica Y3656; <i>msb2::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH19	Isogénica Y3656; <i>sho1::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH20	Isogénica YSTH1; <i>sln1::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH21	Isogénica Y3656; <i>ypd1::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH22	Isogénica Y3656; <i>opy2::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH23	Isogénica Y3656; <i>pbs2::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH24	Isogénica Y3656; <i>kre6::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH25	Isogénica Y3656; <i>gas1::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH26	Isogénica Y3656; <i>chs3::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH27	Isogénica Y3656; <i>slm1::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH28	Isogénica Y3656; <i>slm2::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH29	Isogénica Y3656; <i>pkh1::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH30	Isogénica Y3656; <i>pkh2::natMX4</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YSTH32	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ</i>	Martín <i>et al.</i> , 2015
YASS-1	Isogénica Y3656; <i>slt2-as-natMX4</i>	Dr. Humberto Martín
YASS-2	Isogénica Y3656; <i>gas1::kanMX4; slt2-as-natMX4</i>	Dr. Humberto Martín
YASS-3	Isogénica Y3656; <i>fks1::kanMX4; slt2-as-natMX4</i>	Este trabajo
YASS-4	Isogénica Y3656; <i>nbp2::kanMX4; slt2-as-natMX4</i>	Dr. Humberto Martín
YASS-5	Isogénica Y3656; <i>swi4::kanMX4; slt2-as-natMX4</i>	Dr. Humberto Martín
YASS-6	Isogénica Y3656; <i>spa2::kanMX4; slt2-as-natMX4</i>	Dr. Humberto Martín
YASS1-7	Isogénica Y3656; <i>pho85::kanMX4; slt2-as-natMX4</i>	Dr. Humberto Martín
YASS1-8	Isogénica Y3656; <i>ppz1::kanMX4; slt2-as-natMX4</i>	Dr. Humberto Martín
YMM1	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; slt2::kanMX4; RLM1-6MYC::LEU2</i>	Marín <i>et al.</i> , 2009
HAI161-A	<i>MYO1-mCherry::HIS3</i>	Dr. Heinisch
HSK13-2A	<i>WSC1-GFP::kanMX4</i>	Dr. Heinisch
YMF3	Isogénica 1783, <i>SLT2-6MYC::LEU2</i>	Flández <i>et al.</i> , 2004
YES2	Isogénica Y3656; <i>slt2-as-natMX4; MYO1-mCherry::HIS3</i>	Este trabajo. Haploide procedente de la esporulación del diploide generado mediante cruce de las cepas YASS-1 y HAI161-A

YES3	Isogénica Y3656; <i>gas1::kanMX4; slt2-as-natMX4; MYO1-mCherry::HIS3</i>	Este trabajo. Haploide procedente de la esporulación del diploide generado mediante cruce de las cepas YASS-2 y HAJ161-A
YES4	Isogénica Y3656; <i>slt2-as-natMX4; WSC1-GFP::kanMX4</i>	Este trabajo. Haploide procedente de la esporulación del diploide generado mediante cruce de las cepas YASS-1 y HSK13-2A
YES5	Isogénica Y3656; <i>gas1::kanMX4; slt2-as-natMX4; WSC1-GFP::KanMX4</i>	Este trabajo. Haploide procedente de la esporulación del diploide generado mediante cruce de las cepas YASS-2 y HSK13-2A
YES6	Isogénica Y3656; <i>fks1::kanMX4; slt2-as-natMX4; WSC1-GFP::kanMX4</i>	Este trabajo. Haploide procedente de la esporulación del diploide generado mediante cruce de las cepas YASS-3 y HSK13-2A
YES7	Isogénica BY4741; <i>gga1:: natMX4</i>	Este trabajo
YES8	Isogénica BY4741; <i>gga2::kanMX4</i>	Este trabajo
YES9	Isogénica BY4741; <i>gga1:: natMX4; gga2::kanMX4;</i>	Este trabajo
YES10	Isogénica BY4741; <i>gga1:: natMX4; slt2Δ</i>	Este trabajo
YES11	Isogénica BY4741; <i>gga2::kanMX4; slt2Δ</i>	Este trabajo
YES12	Isogénica BY4741; <i>rcn1::kanMX4</i>	Este trabajo
YES13	Isogénica BY4741; <i>rcn2:: natMX4</i>	Este trabajo
YES14	Isogénica BY4741; <i>rcn1::kanMX4; rcn2:: natMX4</i>	Este trabajo
YES15	Isogénica BY4741; <i>rcn1::kanMX4; slt2Δ</i>	Este trabajo
YES16	Isogénica BY4741; <i>rcn2:: natMX4; slt2Δ</i>	Este trabajo
YES17	Isogénica BY4741; <i>caf20:: natMX4</i>	Este trabajo
YES18	Isogénica BY4741; <i>caf20:: natMX4; slt2Δ</i>	Este trabajo
YES19	Isogénica BY4741; <i>scp160::kanMX4</i>	Este trabajo
YES20	Isogénica BY4741; <i>tim18::kanMX4</i>	Este trabajo
YES21	Isogénica BY4741; <i>bud27::kanMX4</i>	Este trabajo
YES22	Isogénica BY4741; <i>pfk26::kanMX4</i>	Este trabajo
YES23	Isogénica BY4741; <i>sic1::kanMX4</i>	Este trabajo
YES24	Isogénica BY4741; <i>ume6::kanMX4</i>	Este trabajo

La cepa de *Escherichia coli* utilizada para las técnicas de biología molecular fue DH5α: *F'[K12Δ(lacZYA-argF)U169 deoR supE44thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 rta1A1(Φ80lacZ M15)]F'*. En los experimentos de expresión de proteínas se empleó la cepa de *E. coli* Rosetta (*F - ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm pRARE(CamR)*) de Novagen, derivada de la cepa BL21.

2. CONDICIONES DE CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

2.1. Medios de cultivo

Las distintas cepas de *S. cerevisiae* utilizadas fueron cultivadas de rutina en el medio no selectivo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2% y glucosa 2%). El medio YPG es similar al YPD pero sustituyendo la glucosa por galactosa 2%. Para la selección de transformantes y el mantenimiento de los plásmidos se utilizó el medio sintético SD que contiene 1,7g/l de base nitrogenada para levaduras, 5g/l de sulfato amónico y 20g/l de glucosa; suplementado con 1,24g/l de la mezcla de aminoácidos (Adenina: 0,5g; Leucina: 10g, y Alanina, Arginina, Asparragina, Ácido aspártico, Cisteína, Glutamina, Ácido glutámico, Glicina, Histidina, Inositol, Isoleucina, Lisina, Metionina, Ácido para-Aminobenzoico, Fenilalanina, Prolina, Serina, Treonina, Triptófano, Tirosina, Uracilo y Valina: 2g). Esta mezcla puede variar según el experimento, eliminándose de su composición los aminoácidos utilizados en la selección de transformantes. El medio SR tiene la misma composición que el SD pero contiene rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. El medio de esporulación utilizado contiene acetato potásico al 1% y agar al 3%.

Para la adición a los medios de cultivo de compuestos como rojo Congo (*MERCK*), zimoliasa 20T (*ImmunOTM, MP BIOMEDICALS, Inc.*) o sulfato de neomicina (*Sigma*), entre otros, éstos eran disueltos previamente en el solvente adecuado (agua estéril, DMSO o etanol) y se añadían al medio una vez esterilizado y atemperado.

Las células bacterianas fueron cultivadas a 37°C en medio LB (*Luria-Berani*) cuya composición es: 10g/l triptona, 5g/l extracto de levadura y 10g/l de cloruro sódico. Para la selección de transformantes, este medio fue suplementado con el antibiótico ampicilina (*Britapen, G.S.K. o Duchefa Biochemie*) a una concentración de 100µg/ml.

Para la preparación de todos los medios de cultivo se utilizó agua desionizada purificada mediante el sistema *Millipore (Mili-Ro)*. La esterilización de dichos medios se realizó en autoclave a una temperatura de 121°C y 1 atm de presión durante 20 minutos.

Para la obtención de medios sólidos, se utilizó una concentración final de agar al 2%.

2.2. Determinación del crecimiento

El crecimiento de los cultivos de *S. cerevisiae* y *E. coli* fue determinado por turbidimetría, mediante lectura de la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU640.

2.3. Cultivo y recogida de células de levadura

Las cepas se cultivaron en el medio de cultivo líquido apropiado (YPD o SD si las cepas se encontraban transformadas con plásmidos) en agitación a 200rpm y a 24°C o 30°C durante toda la noche y al día siguiente, los cultivos se refrescaron a una DO_{600nm} de 0,3 en medio YPD o SD y se incubaron durante aproximadamente 2-3 horas más a 24°C. De esta manera el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial. Posteriormente, el cultivo se dividía en partes iguales, añadiendo a algunas de ellas la droga o tratamiento a ensayar, mientras que otra actuaba como cultivo control sin tratamiento, siendo ese momento el tiempo cero del experimento. Los cultivos se incubaron seguidamente durante el tiempo indicado para cada experimento, transcurrido el cual, 15ml de células eran recogidas mediante centrifugación a 4°C y 2.600rpm durante 3 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Las cepas transformadas con plásmidos que portan el promotor *GAL1* fueron incubadas en medio SR durante una noche y al día siguiente, las células se inocularon a una DO_{600nm} de 0,2 en medio YPG o se añadió galactosa al medio SR a una concentración final del 2% y se incubaron durante 6 horas, tras las cuales fueron recogidas por centrifugación. La presencia de galactosa en el medio de cultivo induce la expresión de genes situados bajo el control del promotor *GAL1*. La presencia de rafinosa no provoca la inducción de estos genes pero, a diferencia de la glucosa, tampoco los reprime, lo que acelera su inducción tras la adición de galactosa.

3. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las técnicas básicas de biología molecular como extracción de DNA plasmídico de *E. coli* mediante lisis alcalina, digestión con enzimas de restricción, desfosforilación del extremo 5' del DNA, amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc., se realizaron siguiendo los protocolos convencionales de laboratorio descritos en Ausubel et al. (1993) y Sambrook et al. (1989). Además, para la extracción y purificación de DNA plasmídico se utilizaron los sistemas comerciales de la casa *Nzytech* (*NZYMiniprep*), y cuando se precisaron mayores cantidades se empleó el *Qiaquick Plasmid Midi-Kit* (*Qiagen*). La transformación de *E. coli* se realizó según el método de Hanahan (1983) y la de *S. cerevisiae* según el método del acetato de litio (Ito et al., 1983).

Las enzimas de restricción empleadas, la DNA ligasa y la DNA fosfatasa (CIAP) fueron suministradas por la casa comercial *Roche diagnostics*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo

en un *MiniCycler PTC-150* (MJ Research) utilizando las condiciones adecuadas en cada caso. La visualización del DNA se realizó en geles de agarosa al 1%, preparados en tampón TAE (Tris Acetato 0,04M, EDTA 0,1mM), que eran teñidos posteriormente con una solución del agente intercalante Gel-Red y se observaban en un transiluminador de luz UV *MiniLumi* (DNR Bio-imaging systems). La elución de fragmentos de DNA de geles de agarosa se realizó utilizando el kit comercial *Gene-Clean* (Q-BIOgene-BIO101 systems).

3.1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por *Sigma* y están indicados en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias que hibridan dentro de la *cassette* de kanamicina están subrayadas y en negrita están marcadas las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción y los aminoácidos mutados.

Nombre	Secuencia	Función
<i>EcoR1-PspOMI</i>	5'-GGGAATTCGGGCCCATGCCGTTTACAT TTCAGATC-3'	Introducir los puntos de corte <i>PspOM1</i> y <i>BamH1</i> en el vector <i>YCplac111</i> entre <i>EcoR1</i> y <i>HindIII</i> .
<i>BamH1-HindIII</i>	5'-CGGATCCCTAAAGCTTCCCGTTATTATT ATAATTAAACATC-3'	
K2	5'-CCGTGCGGCCATCAAAATG-3'	Hibrida en las <i>cassette</i> de <i>KANMX4</i> y <i>NATMX4</i> ; para comprobar integraciones
K3	5'-GCCCAGATGCGAAGTTAAG-3'	
Bud27 up	5'-CCTCAGACTGTAATAGCCATGGATTGTGTT AGCGGCCCGTACGCTGCAGGTCGAC-3'	Interrumpir <i>BUD27</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741
Bud27 low	5'-GGTTATGGTTTACTGTCCATATGGAGCC GTTGAGAGCGGAAACATCGATGAATTCGAG CTCG-3'	
Bud27 K2	5'-CGATGTGGTGTAAATATTGCG-3'	Comprobación de delección
Bud27 K3	5'-GGTCACCCAGAGTAATGTTG-3'	
Pfk26 up	5'-GGCGTAGAAGAAGGGTTTATTCAAGGG AACAAGGCAAGAGGCGTACGCTGCAGGT CGAC-3'	Interrumpir <i>PFK26</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741
Pfk26 low	5'-CGTGACTTTGGCTGCGATTCATGGTTTTT GCCCTTATATCATCGATGAATTCGAGCTCG- 3'	
Pfk26 K2	5'-CGAGTGGGATACCCGACCG-3'	Comprobación de delección
Pfk26 K3	5'-GAATTGCAGCCACCTAATGG-3'	
Ume6 up	5'-CACTACCGCACTCAAACATTGCATGGA CCTTAACACGCGTACGCTGCAGGTCGAC- 3'	Interrumpir <i>UME6</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741
Ume6 low	5'-GCTCTTCTTTGGCCTCTTTGTTTTTTCT TGATTCCTCCATCGATGAATTCGAGCTCG- 3'	
Ume6 K2	5'-CCACCTCTATCTTCTCTCTC-3'	Comprobación de delección
Ume6 K3	5'-GCAAATCCAACGTGGCTAGG-3'	
Tim18 up	5'GTGATGCGAGGTGCAACAAGTGAAT TTAATACCTTTGGCGTACGCTGCAGGTCGAC -3'	Interrumpir <i>TIM18</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741

Tim18 low	5'-GCAAAAAAAAAAGAAAAAGTATGGGTGA GTCAGTTTCTTCCATCGATGAATTCGAGCTC G-3'	Interrumpir <i>TIM18</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741
Tim18 K2	5'-CAGCCGAATTTGTACTCAC-3'	Comprobación de delección
Tim18 K3	5'-GGTGCTGACTAAACAGTTCC-3'	
Sic1 up	5'CTTGAAGCAGGGACTATTACACGAAAATG ACTCCTTCCACCGTACGCTGCAGGTCGAC-3'	
Sic1 low	5'-CATTTCTTCAATGCTCTTGATCCCTAGATT GAAACAATGCCATCGATGAATTCGAGCTCG- 3'	Interrumpir <i>SIC1</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741
Sic1 K2	5'-GTTTTCTCCAGTGAGACCAG-3'	Comprobación de delección
Sic1 K3	5'-CACTTTTCCGTGTACCATCC-3'	
Scp160 up	5'-CTCCTTCCATTATAACTGCAATGTCTGAA GAACAAACCGCGTACGCTGCAGGTCGAC- 3'	
Scp160 low	5'-GCTTGTCTATCTTCTTAAGGATTTCAAAA CCATTTCACCGGCCATCGATGAATTCGAGCT CG-3'	Interrumpir <i>SCP160</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741
Scp160 K2	5'-GGTATTCATCCACTCCACTG-3'	
Scp160 K3	5'-GAGGGCAGAATTGATTGAGG-3'	
Gga1 up	5'-GGACAAGTCACTACTTCAAGTATAACCC AGACAAGAGTCTTTTAAACATGGAGGCC AGAATACCC-3'	Interrumpir <i>GGA1</i> con la <i>cassette</i> de nurseotricina en cepa silvestre BY4741 y YSTH32 (<i>slt2Δ</i>)
Gga1 low	5'-TCTCTGTAATATAATATGGCATCTACTTT TTTTTCAACTTCTCTACCGAATTGACAGTAT AGCGACCAGCATTAC-3'	
Gga1 K2	5'-GGAGAAAAC TGTAAAGTCC-3'	
Gga2 up	5'- CCCTGTTTT TTTCTGTAAT CACG 3'	Interrumpir <i>GGA2</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741 y YSTH32 (<i>slt2Δ</i>)
Gga2 low	5'- CCTTTACACGATCTAGCATTGC -3'	
Gga2 K2	5'-CCCTTTTCAA GACAGTCTGA-3'	
Rcn1 up	5'- GCCCAATG ACTTCTATAT AAAGTATGG -3'	Interrumpir <i>RCN1</i> con la <i>cassette</i> de kanamicina en cepa silvestre BY4741 y YSTH32 (<i>slt2Δ</i>)
Rcn1 low	5'- GGTAGATAGTGACGATGAATAATCC -3'	
Rcn1 K2	5'-GCACATTAGA TCGAAGTACC-3'	
Rcn2 up	5'-ATGGTAGCAATCAAAAACAAAAAAGA TACATTAGCGTTAGAAAATCGGGAATTACA TGGAGGCCCAGAATACCC-3'	Interrumpir <i>RCN2</i> con la <i>cassette</i> de nurseotricina en cepa silvestre BY4741 y YSTH32 (<i>slt2Δ</i>)
Rcn2 low	5'-CTTTTCCCTTTTCTGCTTTGTCTAATTTA TAGTATTAGTTATGCTCTAGTGCTCAGTATA GCGACCAGCATTAC-3'	
Rcn2 K2	5'-C CATTCTCGTT ACTTTGAGG-3'	
Caf20 up	5'-TTATTTGAGCTGTAACTGAATATAGGAT TAAGAACTTTTATTTAATTTACGACACATG GAGGCCCAGAATACCC-3'	Interrumpir <i>CAF20</i> con la <i>cassette</i> de nurseotricina en cepa silvestre BY4741 y YSTH32 (<i>slt2Δ</i>)
Caf20 low	5'-CAAAATTTATACATAGTACAGTACAGCT GCCTGAAGAAAGCATGAGCGAATGACCAG TATAGCGACCAGCATTAC-3'	
Caf20 K2	5'-GCAACAA TATTACATAG TATTCC-3'	
Fw Act1	5'-ACGAAAGATTACAGAGCCCCA-3'	Amplificación del gen <i>ACT1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
Rv Act1	5'-GCAGATTCCAAACCCAAACA-3'	
Fw Hsp12	5'-GTCCACGACTCTGCCGAAA-3'	Amplificación del gen <i>HSP12</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
Rv Hsp12	5'-GCCAAAGATTACCTTGACCTT-3'	

Fw Bag7	5'-GGCATCAAAGACCCTACAGAAAGA-3'	Amplificación del gen <i>BAG7</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
Rv Bag7	5'-TGACTGTCGTTGTTTGTGTTTGG-3'	
Fw Arg1	5'-ATGATCCAACCATCCCCAAA-3'	Amplificación del gen <i>ARG1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
Rv Arg1	5'-ATCTGCCCAGAATGATGACG-3'	
Fw Ino1	5'-CTTTACTGGCTACGCCCTTG-3'	Amplificación del gen <i>INO1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
Rv Ino1	5'-GTTCTCGAATTTGCCAGCAT-3'	
Fw Pir3	5'-TCGTTGCCAACAGACAGTTC-3'	Amplificación del gen <i>PIR3</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
Rv Pir3	5'-TACCTTCTGGGGTGATGGAC-3'	
Fw Str3	5'-CGGGTGTGTAAATTCGCTTC-3'	Amplificación del gen <i>STR3</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
Rv Str3	5'-ATACCGCAGCAAAGACGAAC-3'	
Fw <i>SLT2</i>	5'-CAATTCTGGGAGATGGCTG-3'	Amplificación de <i>SLT2</i>
Rv <i>SLT2</i>	5'-CAAACCTCCGCGGAGTACG-3'	
Fw <i>slt2</i> ^{E108G}	5'-GGACTATATCTTTATGGTGAAGTTATGGAATGTG-3'	Mutagénesis dirigida del aminoácido glutámico 108 del bolsillo de unión al ATP de Slt2
Rv <i>slt2</i> ^{E108G}	5'-CACATTCCATAAGTTCAACATAAAGATATAGTCC-3'	
Fw <i>slt2</i> ^{T251A}	5'-AAATATTACAAGTTTTAGGGGCAACCCCCAGACGAACTTTAAG-3'	Mutagénesis dirigida del aminoácido treonina 251 susceptible de fosforilación por MAPKs de Slt2
Rv <i>slt2</i> ^{T251A}	5'-CTTAAAGTTTCGTCTGGGGGTGCCCTAAACTGTAAATTT-3'	
Fw <i>BamH1 scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷	5'-CCGGATCCATGTCTGAAGAACAAACCGC-3'	Amplificación del fragmento amino de <i>SCP160</i>
Rv <i>HindIII scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷	5'-CCAAGCTTCTACTTTGAACGCATCCTCTTGG-3'	
Fw <i>BamH1 GGA1</i>	5'-CCGGATCCATGCCACAAAGAATTGAGCTTAC-3'	Amplificación de <i>GGA1</i>
Rv <i>Xba1 GGA1</i>	5'-CCTCTAGATTATATTGTGGGCAAACTGGTC-3'	
Fw <i>BamH1 SOD1</i>	5'-CCGGATCCATGGTTCAAGCAGTCGCAG-3'	Amplificación de <i>SOD1</i>
Rv <i>EcoR1 SOD1</i>	5'-CCGAATTCCTAGTTGGTTAGACCAATGAC-3'	
Fw <i>BamH1 RCN2</i>	5'-CCGGATCCATGGCAAACCAAAAGCAAAATG-3'	Amplificación de <i>RCN2</i>
Rv <i>EcoR1 RCN2</i>	5'-CCGAATTCCTAATGGAAAACTCGTTAAC-3'	
Fw <i>rcn2</i> ^{T49A}	5'-AGTCACTTGCAGTATTACGCGCCGTTGCCATTTTAA-3'	Mutagénesis dirigida de la treonina 49 de Rcn2
Rv <i>rcn2</i> ^{T49A}	5'-TTAAAAATGGCAACGGCGCGTAATACTGCAAGTGACT-3'	
Fw <i>rcn2</i> ^{S152A}	5'-ATAAGGGAGGCTCTTCATTAGCTCCGGAATAATCATCTCTAGA-3'	Mutagénesis dirigida de la serina 152 de Rcn2
Rv <i>rcn2</i> ^{S152A}	5'-TCTAGAGATGATTTATCCGGAGCTAATGAAGAGCCTCCCTTAT-3'	
Fw <i>rcn2</i> ^{S160A}	5'-CGGATAAATCATCTCTAGAAGCGCCAC AATGTTGAAGCTTTC-3'	Mutagénesis dirigida de la serina 160 de Rcn2
Fw <i>rcn2</i> ^{S160A}	5'-GAAAGCTTCAACATTGTGGGCGCTTCTAGAGATGATTTATCCG-3'	

Fw <i>rcn2</i> ^{S255A}	5'-GCCTCAAATCCTCCAAA G CTCCAAGCAT AACGGTTAAC-3'	Mutagénesis dirigida de la serina 255 de Rcn2
Rv <i>rcn2</i> ^{S255A}	5'-GTTAACCGTTATGCTTGG A GCTTTTGGA GGATTTGAGGC-3'	
Fw <i>rcn2</i> ^{S152A/S160A}	5'CTCTTCATTAG G CTCCGGATAAATCATCT CTAGAA GCG CCCACAATG-3	Mutagénesis dirigida de las serinas 152 y 160 de Rcn2
Rv <i>rcn2</i> ^{S152A/S160A}	5'CATTGTGGG CG CTTCTAGAGATGATT ATCCGG A GCTAATGAAGAG-3'	
Fw <i>Bam</i> H1 CAF20	5'-CC G GATCCATGATCAAGTATACTATCGAT G-3'	Amplificación de CAF20
Rv <i>Hind</i> III CAF20	5'-CCA A GCTTTTATGCTTCGTCGTCTTCGT C-3'	
Fw <i>caf20</i> ^{T102A}	5'-GAAGAAGAAACAGAAAC CG ACCAACTT CTACTGTACCAG3'	Mutagénesis dirigida de la treonina 102 de Caf20
Rv <i>caf20</i> ^{T102A}	5' CTGGTACAGTAGAAGTTGG T GCGGTTTC TGTTTCTTCTTC-3'	
Fw <i>Bam</i> H1 Rcn1	5'CC G GATCCATGGGTAATATTATAACGG-3'	Amplificación de RCN1
Rv <i>Bam</i> H1 Rcn1	5'CC G GATCCATCATCGTCATCAGTATCG-3'	
Fw <i>rcn1</i> ^{S113A}	5'-AAAATGTTCTGATAG CG CCCCCAGCATC ACCA-3'	Mutagénesis dirigida de la serina 113 de Rcn1
Rv <i>rcn1</i> ^{S113A}	5'-TGGTGATGCTGGGGG CG CTATCAGGAAC ATTTT-3'	
Fw <i>rcn1</i> ^{S117A}	5'-TATCGCCCCAGCAG C ACCACCTCCCGAA TT-3'	Mutagénesis dirigida de la serina 117 de Rcn1
Rv <i>rcn1</i> ^{S117A}	5'AATTGGGGAGGTGG T GCTGCTGGGGGCG ATA-3'	
Fw <i>rcn1</i> ^{S113A/S117A}	5'-ATGTTCTGATAG CG CCCCCAGCAGCA CCACCTCCCGAA-3'	Mutagénesis dirigida de las serinas 113 y 117 de Rcn1
Rv <i>rcn1</i> ^{S113A/S117A}	5'-TTCGGGAGGTGG T GCTGCTGGGGG CGC TATCAGGAACAT3''	

3.2. Mutagénesis dirigida

La introducción de las mutaciones se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida (Wang y Malcolm, 1999). Para ello se realizó una PCR utilizando una polimerasa de alta procesividad y fiabilidad, la *Pfu Turbo* (Stratagene), y se siguieron las instrucciones del kit *QuikChange Site-directed Mutagenesis kit* (Stratagene). Los oligonucleótidos empleados se diseñaron según estas especificaciones y contenían la mutación deseada. Como molde se usó el plásmido sin la mutación. Tras la reacción de PCR mutagénica, se digirió el producto de PCR con la enzima de restricción *DpnI*, que únicamente digiere DNA metilado, con lo que se eliminó el DNA molde dejando únicamente el sintetizado *de novo* que contiene la mutación deseada. La secuenciación de DNA fue llevada a cabo por la Unidad de Genómica de la UCM que cuenta con un secuenciador automático multicapilar *ABI Prism 3730* (Applied Biosystems).

3.3. Plásmidos utilizados -

Tabla 3: Plásmidos utilizados en este trabajo. -

Nombre	Características relevantes	Procedencia
pCWIST-MKK1*	Plásmido integrativo en el <i>locus</i> HO portando la <i>cassette</i> génica: <i>HO::MLP1p-MKK1^{S386P}-ADHt-natMX4::HO</i> .	Dr. Humberto Martín
pGEX(KG)-SteC	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p GST STEC</i>	Dr. Pablo Fernández Piñar
YCplac111	<i>ori CEN4 LEU2 lacZ</i>	Gietz y Sugino, 1988
pHR0	<i>Ori CEN4 URA3 Amp^R SLT2</i>	Martín <i>et al.</i> , 1993
pHR70	<i>Ori CEN4 URA3 Amp^R</i>	Martín <i>et al.</i> , 1993
YE352-pMLP1-lacZ	<i>ori 2μ bla lacZ(MCS) URA3 MLP1p</i>	García <i>et al.</i> , 2009
pRS316	<i>ori CEN6 URA3 lacZ</i>	Sikorski y Hieter, 1989
pRS316-slt2 ^{K54F}	<i>ori CEN6 URA3 lacZ slt2^{K54F}</i>	Dr. Humberto Martín.
pRS316-slt2 ^{T190A e Y192A}	<i>ori CEN6 URA3 lacZ slt2^{T190A e Y192A}</i>	Dr. Humberto Martín.
pEG(KG)	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p GST</i>	Mitchell <i>et al.</i> , 1993
pEG(KG)-SLT2	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p GST SLT2</i>	Ibarra, 2013
pEG(KG)-slt2-as	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p GST-slt2-as.</i>	Ibarra, 2013
pEG(KG)-MSG5	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p GST-MSG5</i>	Flández <i>et al.</i> , 2004
pGEX(KG)	<i>ori bla Ptac-GST</i>	Guan y Dixon, 1991
pGEX(KG)-RLM1	<i>ori bla Ptac-GST-RLM1</i>	Sanz <i>et al.</i> , 2012
pGEX(KG)-msg5 ^{C319A}	<i>ori bla Ptac-GST msg5^{C319A}</i>	Flández <i>et al.</i> , 2004
pGEX(KG)-msg5NT	<i>ori bla Ptac-GST msg5NT.</i>	Cedido por Eva Tapia
pGEX(KG)-msg5CT ^{C319A}	<i>ori bla Ptac-GST msg5CT^{C319A}</i>	Cedido por Eva Tapia
YCplac111-SLT2-HA	<i>ori CEN4 LEU2 lacZ SLT2-HA</i>	Dr. David Levin.
pRS305-SLT2-myc	<i>ori CEN6 LEU2 lacZ SLT2-6MYC</i>	Flández <i>et al.</i> , 2004
Ylp211-CDC3-mCherry	<i>Integrativo, URA3, mCherry (RFP)-CDC3</i>	Fang <i>et al.</i> , 2010
pLA10H-CDC10-GFP	<i>ori CEN6 HIS3 CDC10-GFP</i>	Cid <i>et al.</i> , 2001
pVD67 PKC1-mCherry	<i>Ori 2μ URA3 Amp^R PKC1-mCHERRY</i>	Fernández-Acero <i>et al.</i> , 2015
pEGH-GST	<i>bla URA3 GAL1p GST-PTP1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-SCP160	<i>bla URA3 GAL1p GST-SCP160</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-MKK1	<i>bla URA3 GAL1p GST-MKK1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-RCN2	<i>bla URA3 GAL1p GST-RCN2</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-CAF20	<i>bla URA3 GAL1p GST-CAF20</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-GGA1	<i>bla URA3 GAL1p GST-GGA1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-GGA2	<i>bla URA3 GAL1p GST-GGA2</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-SOD1	<i>bla URA3 GAL1p GST-SOD1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-FBA1	<i>bla URA3 GAL1p GST-FBA1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-PFK2	<i>bla URA3 GAL1p GST-PFK2</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-CDC33	<i>bla URA3 GAL1p GST-CDC33</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-RNR4	<i>bla URA3 GAL1p GST-RNR4</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-PUP2	<i>bla URA3 GAL1p GST-PUP2</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-SEC31	<i>bla URA3 GAL1p GST-SEC31</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-SEG1	<i>bla URA3 GAL1p GST- SEG1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-PIL1	<i>bla URA3 GAL1p GST- PIL1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-LSP1	<i>bla URA3 GAL1p GST- LSP1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-PST2	<i>bla URA3 GAL1p GST- PST2</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-BBC1	<i>bla URA3 GAL1p GST- BBC1</i>	Open Biosystems

pEGH-GST-PKC1	<i>bla URA3 GAL1p GST- PKC1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-LPP1	<i>bla URA3 GAL1p GST- LPP1</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-NUP159	<i>bla URA3 GAL1p GST- NUP159</i>	Open Biosystems
pEGH-GST-ZEO1	<i>bla URA3 GAL1p GST- ZEO1</i>	Open Biosystems

3.4. Plásmidos generados en este trabajo

El procedimiento de construcción de los plásmidos generados en este trabajo se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4: Plásmidos generados en este trabajo.

Nombre	Procedimiento de construcción y características relevantes
YCplac111-MKK1 *	Se introdujo por PCR los puntos de corte <i>PspOMI</i> y <i>BamH1</i> en el plásmido YCplac111 utilizando el fragmento de DNA amplificado por PCR con los cebadores <i>EcoR1-PspOM1</i> y <i>BamH1-HindIII</i> y con el DNA molde el plásmido pGEX(KG)-SteC. Posteriormente se digirió el plásmido con <i>PspOMI</i> y <i>BamH1</i> y se subclonó el fragmento amplificado con estos puntos en los extremos conteniendo el promotor de <i>MLP1</i> y <i>MKK1</i> ^{S386P} del plásmido pCWIST.
pHR70-MKK1 *	Se digirió el plásmido pHR70 con <i>EcoR1</i> y <i>BamH1</i> para clonar el circuito de amplificación desde el plásmido YCplac111-MKK1 ^{S386P} .
pRS316-SLT2	Se amplificó por PCR el fragmento de <i>SLT2</i> de 2,2Kb existente entre los puntos <i>EcoR1-Sal1</i> utilizando como molde el plásmido pHR0 y los cebadores Fw <i>SLT2</i> y Rv <i>SLT2</i> .
pRS316-slt2-as	Se utilizaron los cebadores Fw <i>slt2</i> ^{E108G} y Rv <i>slt2</i> ^{E108G} y el plásmido pRS316-slt2-as como molde para mutagenizar mediante PCR el glutámico de la posición 108 a glicina. Utilizando los puntos de corte internos de <i>SLT2</i> , <i>HindIII-HindIII</i> , se substituyó <i>SLT2</i> del pRS316-SLT2 por el fragmento de DNA amplificado.
pRS316-slt2 ^{T251A}	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido pRS316-SLT2 utilizando los oligonucleótidos Fw <i>slt2</i> ^{T251A} y Rv <i>slt2</i> ^{T251A} .
pGEX(KG)-SCP160 ¹⁻¹⁰⁷	Amplificación del extremo amino de Scp160 por PCR utilizando DNA genómico procedente de la cepa BY4741 y los oligos Fw <i>BamH1 scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷ y Rv <i>HindIII scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷ y se clonó en pGEMT donde fue secuenciado y subclonado en pGEX(KG).
pGEX(KG)-RCN2	Se construyó de manera similar al plásmido pGEX(KG)- <i>scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷ pero utilizando los cebadores Fw <i>BamH1 RCN2</i> y Rv <i>EcoRI RCN2</i> .
pGEX(KG)-GGA1	Se construyó de manera similar al plásmido pGEX(KG)- <i>scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷ pero utilizando los cebadores Fw <i>BamH1 GGA1</i> y Rv <i>XbaI GGA1</i> .
pGEX(KG)-CAF20	Se construyó de manera similar al plásmido pGEX(KG)- <i>scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷ pero utilizando los cebadores Fw <i>BamH1 CAF20</i> y Rv <i>HindIII CAF20</i> .
pGEX(KG)-SOD1	Se construyó de manera similar al plásmido pGEX(KG)- <i>scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷ pero utilizando los cebadores Fw <i>BamH1 SOD1</i> y Rv <i>EcoRI SOD1</i> .
pGEX(KG)-caf20 ^{T102A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>CAF20</i> utilizando los oligonucleótidos Fw <i>caf20</i> ^{T102A} y Rv <i>caf20</i> ^{T102A} .
pGEX(KG)-rcn2 ^{S152A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>RCN2</i> utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn2</i> ^{S152A} y Rv <i>rcn2</i> ^{S152A} .
pGEX(KG)-rcn2 ^{S160A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>RCN2</i> utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn2</i> ^{S152A} y Rv <i>rcn2</i> ^{S152A} .
pGEX(KG)-rcn2 ^{S255A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>RCN2</i> utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn2</i> ^{S255A} y Rv <i>rcn2</i> ^{S255A} .
pGEX(KG)-rcn2 ^{S35A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>rcn2</i> ^{S255A} utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn2</i> ^{S152A/S160A} y Rv <i>rcn2</i> ^{S152A/S160A} .

pGEX(KG)- <i>rcn2</i> ^{T49A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>RCN2</i> utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn2</i> ^{T49A} y Rv <i>rcn2</i> ^{T49A} .
pGEX(KG)- <i>rcn2</i> ^{35A y T49A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>rcn2</i> ^{35A} utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn2</i> ^{T49A} y Rv <i>rcn2</i> ^{T49A} .
pGEX(KG)- <i>RCN1</i>	Se generó igual que pGEX(KG)- <i>scp160</i> ¹⁻¹⁰⁷ pero utilizando los cebadores Fw <i>BamHI RCN1</i> y Rv <i>BamHI RCN1</i> .
pGEX(KG)- <i>rcn1</i> ^{S113A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>RCN1</i> utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn1</i> ^{S113A} y Rv <i>rcn1</i> ^{S113A} .
pGEX(KG)- <i>rcn1</i> ^{S117A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>RCN1</i> utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn1</i> ^{S117A} y Rv <i>rcn1</i> ^{S117A} .
pGEX(KG)- <i>rcn1</i> ^{25A}	Mutagénesis dirigida sobre pGEX(KG)- <i>RCN1</i> utilizando los oligonucleótidos Fw <i>rcn1</i> ^{S113A/S117A} y Rv <i>rcn1</i> ^{S113A/S117A} .

3.5. Generación de cepas mutantes de delección de *S. cerevisiae*

Para generar cepas mutantes se amplificó mediante PCR el gen de resistencia a kanamicina o nourseotricina flanqueado en los extremos por secuencias que hibridan por delante y por detrás del ORF del gen a deleccionar. La mezcla de reacción estaba formada por 1µl de cada oligonucleótido 100µM, 1µl del plásmido portador de la *cassette* de kanamicina o nourseotricina, 1µl de dNTPs 10mM, 5µl del buffer de la enzima 10X con magnesio y 1µl de la enzima *Expand high fidelity (Roche)* (3,5 U/µl) en un volumen final de 50µl. Las condiciones de la PCR fueron 1 ciclo de 2 minutos a 94°C; 10 ciclos de 15 segundos a 94°C; 30 segundos a una temperatura comprendida entre 45 y 65°C y 8 minutos a 72°C; de 15 a 20 ciclos similares a los anteriores pero añadiendo 5 segundos por cada ciclo a los 8 minutos a 72°C y 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Los oligonucleótidos empleados se denominan gen-up y gen-low respectivamente y están recogidos en la Tabla 2.

El producto de la PCR se integró en el genoma de la levadura mediante transformación, sustituyéndose así la versión silvestre del gen a deleccionar por el gen de resistencia al antibiótico empleado. Los transformantes que portaban la *cassette KANMX4* o *NATMX4* se seleccionaron en placas de YPD suplementadas con 200µg/ml de geneticina (*gibco Life technologies*) o 60µg/ml de nourseotricina (*WERNER BioAgents*).

Con el fin de comprobar la delección de estos genes y la presencia en su lugar del gen de resistencia, se realizaron PCRs desde colonia del mutante en estudio, resuspendiendo las células en 50µl de zimoliasa 20T e incubándolas 10 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 5.000rpm durante 1 minuto y retirar el sobrenadante, las células se hirvieron a 92°C durante 5 minutos y sobre ellas se añadió la siguiente mezcla de reacción: 5µl del Buffer de la enzima 10x,

1µl de dNTPs 10 mM, 1µl de uno de los oligonucleótidos 100µM que hibridan por delante y por detrás del gen que se quiere deleccionar, 1µ de los oligonucleótidos K2 o K3 que hibridan dentro de los genes de resistencia a kanamicina y nourseotricina y van en sentido 3' o 5' respectivamente, 1µl de la enzima *Taq polimerasa* (*Promega*) (50 U/µl) y H₂O hasta un volumen final de 50µl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un primer ciclo de 2 minutos a 97°C, 30 ciclos de la secuencia 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C y 1 minuto y medio a 72°C y una extensión final de 4 minutos a 72°C. Para verificar cada mutante se realizaron dos PCRs independientes para confirmar tanto la región 5' como 3' de cada *locus* genómico. El resultado de cada PCR se analizó mediante visualización del producto generado en un gel de agarosa al 1%, comprobando el tamaño de la banda amplificada con respecto al esperado. Los oligonucleótidos utilizados que hibridaban a unas 500pb de distancia del inicio del ORF y del codón de terminación se denominan gen-K2 y gen-K3 respectivamente (Tabla 2).

3.6. Generación de cepas mutantes haploides de *S. cerevisiae* mediante apareamiento y esporulación

Para generar cepas haploides portadoras de dos mutaciones se cruzaron cepas que contenían cada uno de los alelos deseados. Para inducir la esporulación, las estirpes diploides de *S. cerevisiae* cultivadas durante 24-48 horas en placas de selección según las auxotrofías y resistencias a antibióticos de las cepas originales, se pasaron a YPD líquido durante una noche. Tras concentrar las células se depositaron 200µl de la suspensión en medio sólido de esporulación incubándose a 30°C durante 3-7 días.

Transcurrido ese tiempo se llevó a cabo la disección de tétradas resuspendiendo una masa de células en 200µl de una dilución 1/20 (v/v) de Z (NEE-154 gluculasa (*DuPont Company*, Wilmington USA)) en agua estéril e incubándola durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la rotura de la envuelta del asca. Tras diluir las células con 500µl de agua estéril se realizó una estría con 15µl de esta suspensión en una placa de YPD (de bajo espesor y completamente lisa) y se procedió a la micromanipulación (*Micromanipulador de Singer Instruments*). La placa conteniendo las esporas separadas se incubó a 30°C durante tres días. Las colonias crecidas en el lugar de depósito de cada espora se sembraron en una placa individual de YPD y utilizando un replicador cilíndrico y terciopelos estériles se pasaron a placas de medio sintético completo carentes de leucina, histidina o uracilo, para determinar sus auxotrofías y a placas suplementadas con genética (*gibco Life technologies*) o nourseotricina (*Sigma*) para saber si portaban resistencia a estos antibióticos. Para determinar el tipo sexual se hicieron

experimentos de apareamiento, enfrentando los haploides obtenidos a cepas silvestres de tipo sexual α y α , por separado, en placas YPD.

4. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE MICROARRAYS DE DNA

A excepción de la extracción de RNA, todos los experimentos se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica de la U.C.M. Los experimentos realizados en este trabajo con *microarrays* emplearon soportes de la marca *Affymetrix GeneChip® Yeast Genome 2.0*.

4.1. Extracción de RNA

Las células de *S. cerevisiae* se cultivaron de la forma descrita en el apartado 2.3. dividiendo el cultivo en dos partes iguales y tratando una de ellas con neomicina (10mg/ml) y utilizando la parte no tratada como control. El volumen de cada cultivo recogido fue de 5ml (1×10^7 células/ ml aproximadamente) y la extracción de RNA se realizó utilizando el kit *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*, mediante el procedimiento de rotura mecánica descrito en las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro ND-1000 (*nanodrop*) (1 DO a 260 nm equivale a 40µg/ml de RNA) y su calidad se comprobó mediante cromatografía capilar utilizando el equipo *Nano Bioanalyzer 2100B (Agilent Technologies)*. Para cada condición experimental se procesaron y analizaron tres muestras biológicas independientes.

4.2. Síntesis, marcaje e hibridación del cDNA

El cDNA de doble cadena se sintetizó mediante transcripción reversa con *One-cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix)* a partir de 5µg del RNA extraído. Tras su purificación con el kit *GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix)*, el cDNA se empleó como molde en la reacción de transcripción *in vitro* para generar el cRNA marcado con biotina empleando el kit de marcaje *GeneChip IVT Labeling Kit*. A continuación el cRNA marcado se purificó empleando de nuevo el *Sample Cleanup Module* y para mejorar la sensibilidad en la posterior hibridación con el soporte, se hidrolizó el cRNA en fragmentos de 35 a 200 bases según las instrucciones del kit *Sample Cleanup Module*. La concentración y calidad del cRNA se midieron de nuevo en un espectrofotómetro y cromatógrafo, respectivamente. La hibridación se realizó sobre la plataforma *Affymetrix* que contiene sondas que representan aproximadamente todos los ORFs de *S.cerevisiae*. 15µg del cRNA marcado y disuelto en un coctel de hibridación, se incubó con el soporte conteniendo las sondas durante 16 horas a 45°C. Transcurrido el tiempo de incubación, la plataforma se lavó en la estación de fluidos *GeneChip Fluidics Station 450* y se tiñó con un

conjugado fluorescente de estreptavidina-ficoeritrina, que se une a la biotina del cRNA marcado. Por último, la placa se escaneó y se registraron las señales de fluorescencia emitidas por la ficoeritrina utilizando el escáner *GeneChip® 3000*.

4.3. Análisis de imágenes, procesamiento de datos y métodos estadísticos

Los valores de intensidad de las señales de fluorescencia obtenidas se convirtieron en valores de expresión génica a través del programa *GCRMA (Bioconductor)* (Han *et al.*, 2004). Para expresar las diferencias en los niveles de expresión se calculó un ratio que resultó de dividir la media de las señales de fluorescencia de las muestras tratadas, entre la media de las señales de fluorescencia de las muestras control. Los genes fueron considerados inducidos o reprimidos cuando su ratio de expresión bajo las condiciones analizadas fue $\geq 1,7$ o $\leq 0,6$, respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron con el software *Cyber-t* [(<http://cybert.microarray.ics.uci.edu/>) (Baldi y Long, 2001)]. Aquellos valores con un p-value Bayesiano $< 0,01$ fueron considerados como significativos y los genes correspondientes se consideraron para su posterior análisis.

Los genes inducidos y reprimidos se agruparon funcionalmente en categorías empleando la herramienta bioinformática *GO Term Finder* y *GO Slim Mapper* de la base de datos *SGD* (www.yeastgenome.org). Para realizar la agrupación del perfil transcripcional obtenido en condiciones de inducción con neomicina, comparándolo con otros similares, se empleó el programa *MarQ* (MarQ.cnb.csic.es) y la versión 4.9 del software *MeV MultiExperiment Viewer* [(<http://www.tm4.org/mev>, Dana-Farber Cancer Institute, Boston) (Saeed *et al.*, 2003; Saeed *et al.*, 2006)]. Para determinar los factores de transcripción implicados en la regulación de los genes diferencialmente inducidos se empleó el programa *Yeasttract* (www.yeasttract.com).

4.4. RT-PCR cuantitativa a tiempo real

La RT-PCR se realizó por triplicado con células que se cultivaron y procesaron tal y como se describe en el apartado 4.1 pero recogiendo solo 1ml de volumen. La extracción del RNA se realizó con el kit *Total RNA Purification kit (NORGEN (Biotek))*. La síntesis del cDNA se realizó por transcripción reversa a partir de 2µg de RNA mediante el kit *AS Transcription System (Promega)* y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron 45 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C y finalmente 5 minutos a 4°C y el cDNA se diluyó 1:100 en agua MilliQ. Las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado en placas de 384 pocillos con un volumen de 4,5µl de cDNA, 5µl de *Power SYBR Green PCR Master MIX (Applied Biosystems)* y 0,6µl de la pareja de oligonucleótidos específicos a una concentración de 5µM. Los

oligonucleótidos se diseñaron para hibridar en la primera mitad del extremo 3' de los genes en estudio, mediante el programa *Primer3Plus* o fueron donados por el grupo del Dr. Arroyo (Departamento de Microbiología II, UCM). Las secuencias para amplificar los genes se encuentran en la Tabla 2.

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en el equipo *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time* de la Unidad de Genómica de la UCM y las condiciones de reacción fueron un ciclo de 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 minutos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Para descartar la presencia de productos inespecíficos en la reacción, se realizó el análisis de curvas de disociación para cada uno de los genes amplificados. La expresión de los resultados obtenidos para cada gen se llevó a cabo normalizando los valores con respecto al gen control *ACT1*, cuya expresión es constante, independientemente de las condiciones experimentales, y los ratios de expresión diferencial se calcularon siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por (Livak y Schmittgen, 2001).

5. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES COMPUESTOS

La sensibilidad/resistencia de las cepas empleadas en este trabajo a diferentes tratamientos se ensayó utilizando cultivos en fase de crecimiento exponencial, empleando tres métodos diferentes. En todos los casos, las células de las cepas a estudiar se cultivaron en el medio adecuado a 24°C y en agitación durante toda la noche.

5.1. Ensayo de halo

Para estos ensayos se ajustó la densidad óptica de las células cultivadas toda la noche a 24°C a una DO_{600nm} de 0,05 (aproximadamente 6×10^2 células/ μ l) y se distribuyeron 100 μ l de esta suspensión de manera homogénea sobre la superficie de una placa de YPD. Tras secarse las placas, se depositó sobre la superficie discos de papel estériles de 6mm impregnados con 20 μ l de una solución de cada uno de los compuestos a estudiar y a las concentraciones adecuadas. Se incubaron las placas a 24°C durante 2 días tras lo cual se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados. Los compuestos analizados de este modo, la concentración empleada de cada uno de ellos y el solvente utilizado están recogidos en la Tabla 5.

Tabla 5: Compuestos ensayados, concentraciones utilizadas y disolventes empleados. Todos los ensayos se realizaron con las cepas YSTH1 e YSTH2. Las concentraciones de los compuestos se indican en mg/ml, molaridad (M) o porcentaje (%). En el caso de la anfotericina se utilizaron discos comerciales con la carga indicada.

Compuestos	Concentración	Solvente
Rojo Congo	15mM (10mg/ml)	H ₂ O
SDS	0,1M (3%)	H ₂ O
Ortovanadato sódico	50, 100 y 150mM	H ₂ O
Cloruro de rubidio (RbCl)	2M	H ₂ O
Fluoruro sódico (NaF)	50mM	H ₂ O
Cloruro de potasio (KCl)	13M	H ₂ O
Hidroxiquinolina	2mg/ml	H ₂ O y etanol
Sulfato de neomicina	10M (10mg/ml)	H ₂ O
Cloruro de sodio (NaCl)	13M	H ₂ O
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl)	9M	H ₂ O
Cloranfenicol	20mg/ml	Etanol y acetona
Eritromicina	2mg/ml	H ₂ O y acetona
Fenantrolina	1mg/ml	Etanol y acetona
Canavanina	300µg/ml	H ₂ O
Cafeína	2 y 2,5%	H ₂ O 60°C
Etanol	50%	H ₂ O
Formamida	30%	H ₂ O
Dimetilformamida	30%	H ₂ O
Cloruro de cesio (CsCl)	1M	H ₂ O
Glucosa	20%	H ₂ O
Galactosa	20%	H ₂ O
Glicerol	1 y 0,1M	H ₂ O
Cloruro de hexaminocobalto	1 y 0,1M	H ₂ O
Acetato de litio	1 y 0,1M	H ₂ O
Persulfato de amonio	1y 0,1M	H ₂ O
Tiosulfato sódico	1 y 0,1M	H ₂ O
Thimerosal	1 y 0,1M	H ₂ O
Cloroquina	1 y 0,1M	H ₂ O
Hidroxiurea	60mg/ml	H ₂ O
Monensina	1 y 0,1M	H ₂ O
Saponina	2%	H ₂ O
Teofilina	1 y 0,1M	H ₂ O
Hipoxantina	1 y 0,1M	H ₂ O
Calcoflúor	10mg/ml	H ₂ O

Compuestos	Concentración	Solvente
Lisozima	2%	H ₂ O
Orcinol	1 y 0,1M	H ₂ O
Xanthohumol	5mg/ml	Metanol
H ₂ O ₂	2 en 998	H ₂ O
Clotrimazol	0,3mM (100µg/ml)	Etanol
Anfotericina	10µg	
n-propil galato	1 y 0,1M	H ₂ O
Benomil	150mg/ml	H ₂ O
Wortmannina	1µg/ml	H ₂ O
Rapamicina		H ₂ O
Nocodazol		H ₂ O
Zimoliasa	5u/ml	H ₂ O
Cloruro de litio (LiCl)	1M	H ₂ O
Ácido clorhídrico	1:10	H ₂ O
Tris HCl pH 4-10		H ₂ O
Cloruro de Zn (ZnCl ₂)	1M	H ₂ O
Cloruro de cobalto (CoCl ₂)	1M	H ₂ O
Tampón MES pH 4-9		H ₂ O
Acetato potásico (CH ₃ COOK)	1M	H ₂ O
Sulfito de sodio (Na ₂ SO ₃)	1M	H ₂ O
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	1M	H ₂ O
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	1M	H ₂ O
Lomoxicam	5mg/ml	50:50 Metanol: H ₂ O
Artovastaten	5mg/ml	50:50 Metanol: H ₂ O
Candesartan	5mg/ml	50:50 Metanol: H ₂ O
Simvastatina	5mg/ml	Polietilen glicol
Escitalopram	5mg/ml	H ₂ O
Omeprazol	5mg/ml	H ₂ O
Valsartan	5mg/ml	H ₂ O
Paracetamol	10mg/ml	H ₂ O
Hicroxicortisona base	10mg/ml	DMSO

Ácido monohidratado	10mg/ml	H ₂ O
Lidocaína clorhidrato	10mg/ml	H ₂ O
Metilparaben	10mg/ml	H ₂ O
Yoduro potásico	10mg/ml	H ₂ O
Metronidazol	10mg/ml	DMSO
Peróxido de benzoilo	10mg/ml	DMSO
Geneticina (G418)	10mg/ml	H ₂ O
Ácido salicílico	10mg/ml	DMSO
Sulfato de cobre	10mg/ml	H ₂ O
Minoxidil	10mg/ml	DMSO
EDTA	30mM	H ₂ O
Propilparaben	10mg/ml	DMSO
Ácido ascórbico	10mg/ml	H ₂ O
Ácido bórico	10mg/ml	H ₂ O
Vitamina B12	10mg/ml	H ₂ O
Butilhidroxi tolueno	10mg/ml	DMSO
Hidrocloreuro de Difenhidramina	0,1M (25mg/ml)	H ₂ O

Hidroquinona	10mg/ml	H ₂ O
Ácido pícrico	10mg/ml	H ₂ O
Ácido retinoico	10mg/ml	H ₂ O
Fluoresceína sódica	10mg/ml	H ₂ O
Rojo puceau	10mg/ml	H ₂ O
Timerosal	10mg/ml	H ₂ O
Nitrato de zinc	10mg/ml	H ₂ O
Borax	10mg/ml	H ₂ O
Hidrosulfito de sodio (Na ₂ S ₂ O ₄)	10mg/ml	H ₂ O
Edetato disódico	10mg/ml	H ₂ O
EGTA	30mM	H ₂ O
Loratadina	30mg/ml	H ₂ O
Gentamicina sulfato	10mg/ml	H ₂ O
Kanamicina sulfato	10mg/ml	H ₂ O
Estreptomicina sulfato	10mg/ml	H ₂ O
Tritón	10%	H ₂ O
Caspofungina	20µg/ml	DMSO

5.2. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones decimales seriadas

Se preparó una primera dilución del cultivo en medio líquido, de forma que su DO_{600nm} fuera de 0,5 (aproximadamente 6×10^3 células/µl) y se hicieron 4 o 5 diluciones seriadas adicionales en un volumen de 180µl de H₂O estéril o medio, utilizando placas de 96 pocillos.

Posteriormente, se sembraron con un replicador *Multi-blot* (*replicator VP407, V&P Scientific, INC*) 5µl de cada una de las diluciones preparadas, en placas de medio sólido suplementado con los distintos compuestos a estudiar y se incubaron a 24°C durante 48-72 horas.

5.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido

En estos experimentos se preparó una dilución del cultivo en medio líquido a una DO_{600nm} de 0,009 (aproximadamente 1×10^2 células/µl). En la primera columna de una placa estéril de 96 pocillos se dispensaron 150µl de YPD suplementado con los compuestos a estudiar diluidos previamente en agua y se hicieron 8 diluciones seriadas 1:2 en YPD en las siguientes columnas de la placa (donde se dispensaron previamente 75µl de YPD), transfiriendo 75µl de volumen desde el pocillo anterior y dejando la columna duodécima como control positivo de crecimiento sin droga, incluyendo únicamente 75µl de YPD. Posteriormente, se añadieron 75µl de la suspensión celular indicada anteriormente en todos los pocillos.

Tras 16, 24 y 48 horas de incubación a 30°C en estático, se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (*Microplate Reader Model 680; Bio-Rad*) con el objetivo de determinar el grado de crecimiento en cada pocillo.

5.4. Ensayos de secreción de carboxipeptidasa Y y lisis celular

Los ensayos de carboxipeptidasa (CPY) se adaptaron de (Roberts *et al.*, 1991). Las distintas cepas fueron inoculadas a una DO_{600nm} de 0,5 (aproximadamente 6x10³ células/μl) en un volumen de 180μl de H₂O estéril o medio líquido, utilizando placas de 96 pocillos. Con un replicador *Multi-blot (replicator VP407, V&P Scientific, INC)* se sembraron 5μl de cada uno de los cultivos en placas de medio sólido YPD y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Posteriormente las colonias se replicaron a otra placa de YPD, se cubrieron con una membrana de nitrocelulosa (*Hybond, Amersham*) y se cultivaron durante 24 horas. En la membrana se realizó una inmunodetección como se indica en el apartado 9.3 utilizando el anticuerpo primario anti-CPY obtenido en ratón (*Molecular Probes, Eugene*) a una dilución 1:1000.

Para determinar lisis celular, estas mismas gotas se replicaron en placas suplementadas con 50μg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (BCIP; *Roche*) y se cultivaron durante 24 horas a 37°C.

6. RASTREO SOBRE UNA SUB-COLECCIÓN DE MUTANTES DELECCIONADOS EN GENES NO ESENCIALES DE LEVADURA

Para realizar un rastreo de supresión fenotípica se utilizó una sub-colección de mutantes relacionados con señalización y apoptosis (Tabla 6), pertenecientes a la colección de mutantes haploides de levadura en genes no esenciales de *Euroscarf*, distribuida en placas de 96 pocillos que se transformó con el plásmido Ycplac111-IPAC siguiendo una variante del protocolo estándar de transformación de levaduras adaptada para placas multipocillos (Gietz y Woods, 2002). Las placas se incubaron a 30°C durante 72 horas hasta la aparición de un sedimento en el pocillo de la placa, correspondiente a levaduras que se habían transformado con el plásmido. La eficiencia de transformación obtenida en el rastreo primario fue del 98%. El sedimento se resuspendió y se transfirieron 5μl a una nueva placa multipocillo con 200μl medio SD carente de leucina. A continuación se introdujo el replicador en la placa que contenía los transformantes y se sembraron gotas en medio sólido SD carente de leucina y con distintos estímulos de la ruta. Las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C. Tras la incubación se identificó visualmente en qué mutantes se producía un efecto de supresión del fenotipo de inhibición del crecimiento

causado por el circuito IPAC, en comparación con la cepa silvestre también transformada con el circuito.

Tabla 6: Sub-colección de cepas mutantes delecionadas en genes no esenciales de señalización y apoptosis pertenecientes a la colección Euroscarf utilizadas en el rastreo de supresión.

CEPAS						
<i>psk1Δ</i>	<i>rri1Δ</i>	<i>hac1Δ</i>	<i>sdp1Δ</i>	<i>ypt6Δ</i>	<i>mdg1Δ</i>	<i>pho85Δ</i>
<i>lte1Δ</i>	<i>lrg1Δ</i>	<i>rgd2Δ</i>	<i>rpi1Δ</i>	<i>sph1Δ</i>	<i>psy2Δ</i>	<i>arl3Δ</i>
<i>gem1Δ</i>	<i>sok1Δ</i>	<i>far7Δ</i>	<i>pog1Δ</i>	<i>bud6Δ</i>	<i>wsc2Δ</i>	<i>rlm1Δ</i>
<i>gpb2Δ</i>	<i>pph3Δ</i>	<i>cmk1Δ</i>	<i>yvh1Δ</i>	<i>mid2Δ</i>	<i>cla4Δ</i>	<i>gde1Δ</i>
<i>fus3Δ</i>	<i>bmh2Δ</i>	<i>lcb3Δ</i>	<i>bit61Δ</i>	<i>dcr2Δ</i>	<i>ypt11Δ</i>	<i>bem3Δ</i>
<i>ede1Δ</i>	<i>ste5Δ</i>	<i>uli1Δ</i>	<i>scp160Δ</i>	<i>ste11Δ</i>	<i>bxi1Δ</i>	<i>rny1Δ</i>
<i>ybl055cΔ</i>	<i>csn9Δ</i>	<i>erv14Δ</i>	<i>tax4Δ</i>	<i>rom2Δ</i>	<i>lem3Δ</i>	<i>rds2Δ</i>
<i>ptc3Δ</i>	<i>plp1Δ</i>	<i>gpg1Δ</i>	<i>bck1Δ</i>	<i>tus1Δ</i>	<i>ssk2Δ</i>	<i>mkk2Δ</i>
<i>yel1Δ</i>	<i>vps64Δ</i>	<i>hos2Δ</i>	<i>pbs2Δ</i>	<i>cna1Δ</i>	<i>aif1Δ</i>	<i>bem4Δ</i>
<i>boi1Δ</i>	<i>akr1Δ</i>	<i>mds3Δ</i>	<i>far1Δ</i>	<i>sst2Δ</i>	<i>pho80Δ</i>	<i>oye3Δ</i>
<i>rtg3Δ</i>	<i>mth1Δ</i>	<i>kex1Δ</i>	<i>tpk1Δ</i>	<i>ypt7Δ</i>	<i>izh2Δ</i>	<i>tco89Δ</i>
<i>slm4Δ</i>	<i>dpp1Δ</i>	<i>sip2Δ</i>	<i>ecm25Δ</i>	<i>gis4Δ</i>	<i>cmk2Δ</i>	<i>tpk2Δ</i>
<i>vps15Δ</i>	<i>dpl1Δ</i>	<i>ypt32Δ</i>	<i>nuc1Δ</i>	<i>cmp2Δ</i>	<i>psk2Δ</i>	<i>cln2Δ</i>
<i>sif2Δ</i>	<i>gic2Δ</i>	<i>pde1Δ</i>	<i>tdh2Δ</i>	<i>cpr3Δ</i>	<i>rtg1Δ</i>	<i>plc1Δ</i>
<i>arl1Δ</i>	<i>ysp2Δ</i>	<i>rtg2Δ</i>	<i>gea1Δ</i>	<i>ndi1Δ</i>	<i>ira2Δ</i>	<i>dss4Δ</i>
<i>cos111Δ</i>	<i>vps74Δ</i>	<i>msb2Δ</i>	<i>tor1Δ</i>	<i>mss1Δ</i>	<i>pkh2Δ</i>	<i>sro7Δ</i>
<i>erv15Δ</i>	<i>rga2Δ</i>	<i>kss1Δ</i>	<i>csn12Δ</i>	<i>csi1Δ</i>	<i>wsc3Δ</i>	<i>tip41Δ</i>
<i>ert1Δ</i>	<i>sac7Δ</i>	<i>rom1Δ</i>	<i>sfk1Δ</i>	<i>far8Δ</i>	<i>rri2Δ</i>	<i>smk1Δ</i>
<i>rgd1Δ</i>	<i>dfm1Δ</i>	<i>rsr1Δ</i>	<i>bud2Δ</i>	<i>rsf1Δ</i>	<i>spt20Δ</i>	<i>opy2Δ</i>
<i>ypt10Δ</i>	<i>hkr1Δ</i>	<i>tdh3Δ</i>	<i>rcn1Δ</i>	<i>far3Δ</i>	<i>slg1Δ</i>	<i>syt1Δ</i>
<i>pps1Δ</i>	<i>sip1Δ</i>	<i>ste20Δ</i>	<i>tpk3Δ</i>	<i>Avo2Δ</i>	<i>rts1Δ</i>	<i>ydr346cΔ</i>
<i>bud3Δ</i>	<i>pkh3Δ</i>	<i>opi1Δ</i>	<i>ste3Δ</i>	<i>ymr074cΔ</i>	<i>std1Δ</i>	<i>ydr395wΔ</i>
<i>ste50Δ</i>	<i>snf1Δ</i>	<i>npr3Δ</i>	<i>cnb1Δ</i>	<i>sno1Δ</i>	<i>vps21Δ</i>	<i>ygl129cΔ</i>
<i>fyv5Δ</i>	<i>pkh1Δ</i>	<i>gpa1Δ</i>	<i>ypt52Δ</i>	<i>asc1Δ</i>	<i>arf3Δ</i>	<i>ygl231cΔ</i>
<i>rhb1Δ</i>	<i>npr2Δ</i>	<i>yhr022cΔ</i>	<i>irs4Δ</i>	<i>cin4Δ</i>	<i>ras1Δ</i>	<i>ygr192cΔ</i>
<i>snt1Δ</i>	<i>gpa2Δ</i>	<i>yhi9Δ</i>	<i>sap190Δ</i>	<i>fus2Δ</i>	<i>rgs2Δ</i>	<i>yhr008cΔ</i>
<i>ssk22Δ</i>	<i>gal83Δ</i>	<i>slt2Δ</i>	<i>rho4Δ</i>	<i>glc8Δ</i>	<i>rga1Δ</i>	<i>yjr048wΔ</i>
<i>ptc1Δ</i>	<i>ypt31Δ</i>	<i>gic1Δ</i>	<i>pxl1Δ</i>	<i>crz1Δ</i>	<i>bag7Δ</i>	<i>ykl056cΔ</i>
<i>gpr1Δ</i>	<i>ptp3Δ</i>	<i>ire1Δ</i>	<i>sdc25Δ</i>	<i>slm2Δ</i>	<i>lcb4Δ</i>	<i>ykr042wΔ</i>
<i>sit4Δ</i>	<i>ptc2Δ</i>	<i>ksp1Δ</i>	<i>yll017wΔ</i>	<i>msg5Δ</i>	<i>gsp2Δ</i>	<i>yll001wΔ</i>
<i>get3Δ</i>	<i>boi2Δ</i>	<i>oye1Δ</i>	<i>spa2Δ</i>	<i>por1Δ</i>	<i>mca1Δ</i>	<i>ymr016cΔ</i>
<i>rdi1Δ</i>	<i>sho1Δ</i>	<i>yhr182wΔ</i>	<i>ssk1Δ</i>	<i>mks1Δ</i>	<i>ptp2Δ</i>	<i>ynl021wΔ</i>
<i>arf2Δ</i>	<i>dse1Δ</i>	<i>skn7Δ</i>	<i>gis3Δ</i>	<i>rho2Δ</i>	<i>ste4Δ</i>	<i>yor043wΔ</i>
<i>rgt2Δ</i>	<i>pea2Δ</i>	<i>bar1Δ</i>	<i>hog1Δ</i>	<i>ypt53Δ</i>	<i>mkk1Δ</i>	<i>ypl116wΔ</i>
<i>ste7Δ</i>	<i>bem2Δ</i>	<i>pkp1Δ</i>	<i>far10Δ</i>	<i>ras2Δ</i>	<i>tim18Δ</i>	<i>ypl120wΔ</i>
<i>arf1Δ</i>	<i>bmh1Δ</i>	<i>fis1Δ</i>	<i>vps34Δ</i>	<i>nma111Δ</i>	<i>rax1Δ</i>	<i>gpb1Δ</i>
<i>snf3Δ</i>	<i>wwm1Δ</i>	<i>fyv10Δ</i>	<i>rck2Δ</i>	<i>far11Δ</i>	<i>pde2Δ</i>	<i>srv2Δ</i>
<i>ack1Δ</i>	<i>ste2Δ</i>	<i>slm1Δ</i>	<i>lcb5Δ</i>			

7. ANÁLISIS MICROSCÓPICO Y TINCIÓN DE ACTINA, PARED CELULAR Y MEMBRANAS

Para la microscopía de fluorescencia, las células se incubaron en medio selectivo a 30°C durante toda la noche y se refrescaron en el mismo medio a DO_{600} de 0,3. Tras 2 horas se añadió el estímulo a estudiar a la concentración indicada en cada experimento o el inhibidor 2,3 DMB-PP1 en el caso de que se utilizara el mutante sensible a análogos de ATP, y se incubaron a 30°C en agitación durante 2-3 horas. A continuación las células fueron recogidas para visualizarlas con un microscopio de fluorescencia *Eclipse TE2000U Nikon* o *ZEISS Imager.Z1*. Las imágenes digitales fueron captadas mediante la utilización de una cámara *Orca C4742- 95-12ER (Hamamatsu)* acoplada al microscopio y procesadas con el programa *HCIImage Hamamatsu* o con cámara *Photometrics Cool SNAP HQ* y procesadas con el programa *MetaMorph Offline*, respectivamente.

La observación del citoesqueleto de actina en células de levadura se llevó a cabo mediante su tinción con rodamina-faloidina según el protocolo de Jiménez y colaboradores (1998). Las muestras se recogieron por centrifugación y se fijaron añadiendo 1/7 del volumen de cultivo de formaldehído al 35-40% durante una hora a 4°C. Posteriormente se lavaron tres veces con un tampón que contiene 3ml de KH_2PO_4 1M, 3ml de $MgCl_2$ 0,1M, 1,5ml de EGTA 0,2M pH 7,5 y 22,5ml de agua. A continuación se resuspendieron e incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos en 100µl de dicho tampón, más 50µl de Tritón X-100 y se lavaron 3 veces con PBS. Después se pasaron a 100µl de una solución de rodamina-faloidina a una concentración de 4µg/ml (*Sigma*), se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron 3 veces con PBS, y se procedió a su observación en el microscopio de fluorescencia.

Para la tinción de membranas internas se utilizó el marcador FM4-64 (*Molecular Probes*) tal y como describen Vida y Emr (1995) para lo que las células fueron recogidas y resuspendidas en el mismo medio al que se añadió FM4-64 a una concentración final de 40µM, y se incubaron en agitación durante 30 minutos, o dos horas a 30°C, tras lo cual fueron recogidas y observadas al microscopio.

8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

Este tipo de ensayo se utilizó para cuantificar los niveles de expresión de la fusión transcripcional de la región promotora del gen *MLP1*, al gen *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa. Las cepas en estudio, transformadas con el plásmido multicopia correspondiente,

se cultivaron y procesaron según se describe en el apartado 2.3 y posteriormente se resuspendieron en 150µl de tampón de lisis (100mM Tris-HCl, 1mM DTT y 20% glicerol) y 5µl de para-metil-sulfonyl-fluoruro (PMSF) 0,1M. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos eppendorf donde se añadió 1/3 del volumen de bolitas de vidrio de 1mm de diámetro (*Sartorius*) para romper las células en la *Fast-Prep®-24* (*M.P. Biomedicals*), aplicando dos pulsos a una fuerza de 5,5 durante 30 segundos. Posteriormente se centrifugó a 13000rpm y 4°C durante 15 minutos para recuperar los sobrenadantes. La cantidad de proteína total del extracto celular obtenido se midió mediante el método de Bradford. El ensayo de β-galactosidasa se realizó en formato de placas multipocillos, tomando como base el método descrito por Amberg (2005). La mezcla de reacción se preparó en 70µl de tampón Z (16,1g/l Na₂PO₄+7H₂O, 5,5g/l NaH₂PO₄, 0,75g/l KCl y 0,246g/l MgSO₄+7H₂O) con β mercaptoetanol (2,7ml/l), a los que se añadieron después 5-10µl del extracto proteico en tampón de lisis. A continuación, se añadieron 20µl de ONPG (orto-nitro-fenil-galacto-piranósido (*Sigma*) 4mg/ml. El ONPG es un sustrato de la enzima β-galactosidasa que lo convierte en galactosa y orto-nitrofenol, siendo este último compuesto de color amarillo medible espectrofotométricamente a una longitud de onda de 415 nm. La placa así preparada se incubó a 30°C hasta que apareció la coloración amarilla y se paró la reacción mediante la adición de 50µl de Na₂CO₃ 1M. La medida de las absorbancias se realizó en un lector de placas. El resultado se expresó calculando la actividad específica β-galactosidasa, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{Actividad específica} \times \text{Absorbancia}_{415} \times 0,17}{0,0045 \times \text{proteína (mg/ml)} \times \text{volumen de extracto (ml)} \times \text{tiempo de incubación (min)}}$$

9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

9.1. Obtención de extractos y preparación de muestras

Las células se cultivaron y recogieron como se describe en el apartado 2.3. Para la preparación de los extractos proteicos se siguió el método descrito por Martín y colaboradores (2000). Para ello, las células se resuspendieron en 150µl de tampón de lisis de proteínas con inhibidores de proteín fosfatasas (50mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0,1% SDS, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM NaF, 50mM β-glicerol fosfato, 5mM pirofosfato sódico y 1mM de ortovanadato sódico). Este tampón se suplementó en el momento de su uso con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets, Roche*), que se utilizan a una concentración de un comprimido por cada 10ml de tampón de lisis y se

añadió también PMSF a una concentración final de 1mM. Tras romper las células con bolitas de vidrio (0,5-0,75mm de diámetro) por agitación en *Fast-Prep®* y recuperar los sobrenadantes, se determinó la concentración de proteína total en los extractos, midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro *Beckman DU 640* (una unidad de absorbancia corresponde aproximadamente a 1mg/ml de proteína). A continuación se igualaron todas las concentraciones proteicas con tampón de lisis en un volumen total de 50µl y se añadieron 50µl de tampón de carga SDS-PAGE 2x (125mM Tris-HCl pH 6,8, 5% SDS, 25% glicerol, 0,6g de azul de bromofenol) al que se añadió en el momento de su uso 1 parte de DTT 1M por cada 4 de tampón. Por último, las muestras se hirvieron durante 5 minutos para la desnaturalización de las proteínas.

9.2. Electroforesis de proteínas y transferencia a membranas de nitrocelulosa

Para la separación electroforética de las proteínas de los extractos se utilizaron geles de poliacrilamida constituidos por un separador al 10% y un concentrador al 5% en condiciones desnaturalizantes, con SDS. La electroforesis se realizó en cubetas *Miniprotean II Cell (Bio-Rad)*, a un voltaje entre 150-200 V. La composición del tampón de electroforesis fue de 196mM glicina, 0,1% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8,3. El patrón de pesos moleculares utilizado procedía de *Invitrogen* o *Bio-Rad*.

Las proteínas separadas durante la electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 0.45µm (*Hybond, Amersham*) de aproximadamente 6x9 cm. Se utilizaron cubetas de transferencia en húmedo *Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad)* y la transferencia se realizó con un voltaje constante de 100 V durante 1 hora, protegiendo tanto la membrana como el gel con papel *Whatman* 3mm y con dos esponjas. Para el tampón de transferencia se mezcló un volumen del tampón de transferencia concentrado 10X (58g/l Tris-HCl, 29g/l de glicina, 3,7g/l de SDS) con dos volúmenes de metanol y siete volúmenes de agua destilada.

9.3. Inmunodetección

El revelado de las membranas se llevó a cabo por fluorescencia utilizando el sistema *Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences)* en el que las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora con leche al 5% diluida en PBS. Posteriormente las membranas se incubaron en agitación con el anticuerpo primario diluido en una solución de PBS-Tween-20 al 0,1% (T-PBS) y 1% de leche durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. A continuación se llevaron a cabo al menos 4 lavados de 5 minutos cada uno con T-PBS y se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo, bien con espectro de emisión a 680nm (canal de detección 700) o bien a 780nm

(canal de detección 800) (LI-COR) y diluido en la misma solución que el primero. Esta segunda incubación se realizó en oscuridad y agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras los lavados del anticuerpo secundario con T-PBS, las membranas se escanearon con el escáner *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences).

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7: Descripción de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpos	Características	Dilución	Casa comercial
Anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)	Policlonal de conejo	1:2000	<i>Cell Signalling</i>
Anti-Slt2	Policlonal de conejo	1:2000	Martín <i>et al.</i> , 1993
Anti- α actina Clon C4	Monoclonal de ratón	1:1000	<i>Immuno MP Biomedicals</i>
Anti-G6PDH	Policlonal de conejo	1:50.000	<i>Sigma</i>
Anti-GST (Z-5)	Policlonal de conejo	1:2000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Anti-Myc, clon 9E10	Monoclonal de ratón	1:1000	<i>Covance</i>
Anti-HA, clon 11	Monoclonal de ratón	1:1000	<i>Covance</i>
Anti-GFP (JL-8)	Monoclonal de ratón	1:2000	<i>Clontech</i>
Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Policlonal de conejo	1:1000	<i>Cell Signalling</i>
Anti CPY	Monoclonal de ratón	1:1000	<i>Molecular Probes</i>
Anti-tioP-éster	Monoclonal de conejo	1:5000	<i>Epitomics</i>
IRDye 800CW Goat anti-rabbit	Ac. secundario de conejo (verde)	1:5000	<i>LI-COR Biosciences</i>
IRDye 680CW Goat anti-rabbit	Ac. secundario de conejo (rojo)	1:5000	<i>LI-COR Biosciences</i>
IRDye 680CW Goat anti-mouse	Ac. secundario de ratón (rojo)	1:5000	<i>LI-COR Biosciences</i>

10. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES FUSIONADAS A GST EN *E. coli*

Para la producción de GST y proteínas fusionadas a GST se utilizó la cepa de *E. coli* Rosetta transformada con los correspondientes plásmidos derivados del pGEX(KG). Los clones obtenidos se cultivaron durante toda la noche en medio LB suplementado con ampicilina (LBA). Al día siguiente se refrescaron en LBA a una DO_{600nm} de 0,2 y se incubaron durante 2 horas a 37°C tras lo cual se añadió isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0,5mM para inducir la expresión de las proteínas en fusión a GST y se incubaron nuevamente durante 2 horas a 30°C. A continuación, se recogieron las células por centrifugación a 5.000rpm a 4°C y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis (890 μ l de PBS más 1 μ l de DTT 1M, 10 μ l de PMSF 100mM y 100 μ l de inhibidores de proteasas). A continuación se añadió lisozima a una concentración final de 1,25mg/ml y se incubaron las muestras 20 minutos en hielo antes de

proceder a su sonicación (3 veces en pulsos de 30 segundos con 30 segundos de reposo entre cada uno en un sonicador *Vibra Cell (Sonios Materials)*). Una vez realizada la sonicación, se centrifugaron las muestras a 13.000rpm durante 15 minutos para clarificar los sobrenadantes. La fracción soluble y la fracción sedimentada fueron analizadas mediante SDS-PAGE. Para teñir el gel, se sumergió en la solución de azul de Coomassie G-250 (0.1% en metanol al 50%, 10% ácido acético en agua Milli-Q) durante 30 minutos. A continuación, se procedió a la decoloración del gel en una solución de 25ml de ácido acético, 37,7ml de etanol y 437,5ml de agua. En caso necesario, se verificó la expresión de las proteínas mediante transferencia a membrana de nitrocelulosa y *Western blotting* con anticuerpos anti-GST.

11. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GST-*slt2-as* ACTIVO EN *S. cerevisiae*

Se utilizó la cepa de levadura Y00993 (*slt2Δ*) transformada con los plásmidos pEG(KG) o pEG(KG)-*slt2-as*. Estas células se cultivaron durante toda la noche a 30°C en medio SR carente de uracilo. Al día siguiente, se refrescaron los cultivos hasta una DO_{600nm} de 0,2-0,3 en medio YPG durante 3 horas. Para activar Slt2 se añadió rojo Congo a una concentración final de 30µg/ml durante 3 horas más. Posteriormente las células se recogieron mediante centrifugación a 4°C y los sedimentos celulares se resuspendieron en 300µl de tampón de lisis con inhibidores de fosfatasa (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA pH 8.0, 300mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10mM NaF, 10mM $Na_4P_2O_7$) al que se añadió cóctel de inhibidores de proteasas, y se rompieron como en apartados anteriores. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al que se añadió Tritón X-100 al 1% y tras 10 minutos en hielo se centrifugó otros 10 minutos a 13.000 rpm.

Los extractos proteicos fueron valorados mediante medida de la absorbancia a 280 nm y la cantidad de proteína se equilibró mediante dilución con tampón de lisis. A estos extractos (~800-900µl) se añadieron 100µl de una mezcla al 50% de buffer de lisis y matriz de *Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)* y se sometieron a agitación rotatoria durante 2 horas a 4°C para permitir la unión de GST y GST-*slt2-as*. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 3.000 rpm y se lavó la resina 3 veces con 1ml de tampón de lisis y dos veces con 1ml de tampón quinasa frío (50mM Tris HCl pH 7,5, 200mM NaCl, 10mM MgCl, 1mM ortovanadato sódico, 5mM pirofosfato sódico, 50mM fluoruro sódico y 80mM β-glicerol fosfato). Por último, los extractos proteicos se resuspendieron en 50µl de tampón quinasa.

12. ENSAYO QUINASA CON *slt2-as* Y ATPγS SOBRE PROTEÍNAS RECOMBINANTES FUSIONADAS A GST

Partiendo de los extractos proteicos obtenidos en el apartado anterior, se tomaron 25μl de la matriz con GST o GST-*slt2-as* en tampón quinasa y se le añadieron 4μl de extracto celular conteniendo proteínas recombinantes producidas en *E. coli* o 15μl de extracto celular conteniendo proteínas producidas en *S. cerevisiae*. Para que tuviera lugar la reacción se añadieron a cada muestra 1μl de ATP 100mM (*Biolog Life Science Institute*) y 1μl de N6-feniletil-ATPγS 10mM (*Biolog Life Science Institute*) y se incubaron durante 30 minutos a 30°C. La reacción se paró añadiendo EDTA a una concentración final de 20mM.

Para la alquilación del sustrato tiofosforilado, se añadió p-nitrobencil mesilato (PNBM) a una concentración final de 2,5mM (*Abcam Biochemicals*) y se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, para detener la reacción de alquilación y eluir las proteínas de la matriz se añadieron 6μl del buffer de carga de proteínas 5X (Tris HCl 1M pH 8, 15% 25% β-mercatoetanol, 25% Glicerol, 1 punta de azul de bromofenol) y se hirvieron las muestras a 95°C durante 5 minutos.

Para detectar las proteínas tiofosforiladas se realizará un *Western blotting* utilizando el anticuerpo anti-tiofosfato éster y anti-GST como control de carga.

13. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado varias herramientas bioinformáticas y consultado diferentes bases de datos disponibles en internet:

-Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>): base de datos de revistas científicas de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos.

-Saccharomyces genome Database (SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>): servidor de la Universidad de Stanford con acceso a herramientas para el análisis de secuencias de *S. cerevisiae*, proyectos de genómica funcional, bibliografía, etc.

-GeneCodis (<http://genecodis.dacya.ucm.es/>): herramienta de la red que integra diferentes fuentes de información para la búsqueda de las características biológicas que frecuentemente co-ocurren en un conjunto de genes y clasificarlos por la significación estadística.

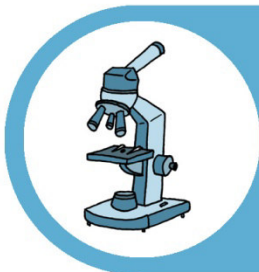
-Funspec (<http://funspec.med.utoronto.ca/>): proporciona un resumen de las clases funcionales, localizaciones celulares, complejos de proteínas, etc, que están sobre-representados en una lista de genes.

-YEASTRACT (*Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking*) (<http://www.yeasttract.com>): base de datos en la que hay depositada información sobre más de 30990 asociaciones entre factores de transcripción de genes de *S. cerevisiae*, y que se basa en más de 1000 referencias bibliográficas. También incluye la descripción de los sitios específicos de unión a DNA de más de 100 factores de transcripción.

-MarQ (MarQ.cnb.csic.es): base de datos de patrones de expresión diferencial de genes (*microarrays*). Indica la relevancia de los experimentos anteriores y permite el acceso a los datos procesados de miles de muestras mediante un interfaz que facilita su exploración en profundidad.

-PhosphoGRID (<http://www.phosphogrid.org/>): base de datos de los sitios de fosforilación verificados experimentalmente *in vivo* de las proteínas del organismo modelo *S. cerevisiae*.

-Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>): permite la búsqueda de similitudes entre las secuencias de DNA o de proteínas disponibles en las bases de datos.



RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE UNA VERSIÓN DE Slt2 SENSIBLE A ANÁLOGOS DE INHIBIDORES DE QUINASAS

1.1. La versión de Slt2 sensible a análogos de inhibidores de quinasas es funcional

Siguiendo la metodología desarrollada por Bishop y colaboradores (2000b), nuestro grupo de investigación construyó una versión mutante de Slt2 que tiene sustituido el aminoácido glutámico de la posición 108 del bolsillo de unión al ATP por una glicina (*slt2-as*). Esta modificación agranda el centro catalítico y eso permite que esta MAPK acepte análogos de ATP más voluminosos que los inhibidores convencionales. Para que *slt2-as* fuera versátil y pudiera caracterizarse en cualquier cepa de levadura, insertamos esta versión en un vector centromérico y bajo el control de su propio promotor. Una vez obtenido este plásmido, lo primero que hicimos fue comprobar si la proteína Slt2-as que se expresaba en las células de levadura transformadas con dicho plásmido, era funcional en ausencia del inhibidor. Así, estudiamos su capacidad para complementar la sensibilidad a cafeína y rojo Congo de un mutante *slt2Δ*. Como se observa en la Figura 16, el alelo *slt2-as* recupera el crecimiento del mutante, igual que la versión silvestre *SLT2*.

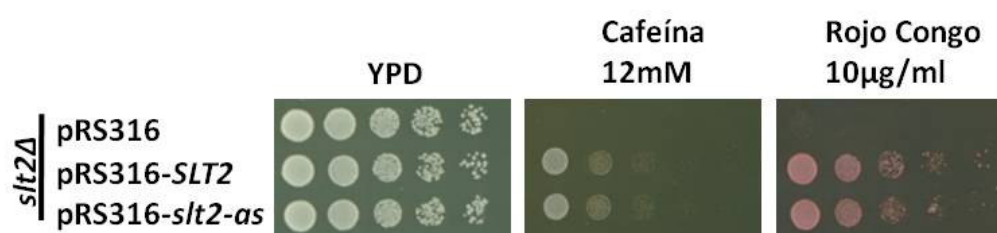


Figura 16: Estudio de sensibilidad. Ensayo de crecimiento en gotas mediante diluciones decimales seriadas del mutante *slt2Δ* (Y00993) transformado con el vector centromérico pRS316 vacío, pRS316-*SLT2* o pRS316-*slt2-as* en placas de YPD suplementadas con 12 mM de cafeína o 10 μg/ml de rojo Congo. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas.

1.2. Slt2-as es inhibible por análogos de inhibidores de quinasas

Lo siguiente fue comprobar si esta versión de Slt2 es sensible a distintos inhibidores derivados de pirazol-pirimidina (PP1) y si estos inhibidores más voluminosos que PP1 actúan sólo sobre la versión mutada y no sobre la silvestre. Para ello, analizamos la sensibilidad a rojo Congo de un mutante *slt2Δ* transformado con el vector vacío (como control), pRS316-*SLT2* o pRS316-*slt2-as* en presencia de concentraciones fijas de 2,3-dimetilbencil-pirazol-pirimidina 1 (2,3-DMBPP1), 1-(terc-butil)-3-(naftaleno-1-metil)-1H-pirazol [3,4-*d*]pirimidina-4-amina (1NM-PP1) y 1-(terc butil)-3-(1-naftaleno)-1H-pirazol[3,4-*d*]pirimidina-4-amina (1NA-PP1). Como se observa en la Figura 17, ninguno de los inhibidores afecta significativamente a la sensibilidad de la cepa

que expresa Slt2 silvestre, mientras que todos reducen la CMI de rojo Congo en la cepa que expresa Slt2-as, siendo el 2,3-DMBPP1 el inhibidor más eficaz de esta quinasa modificada.

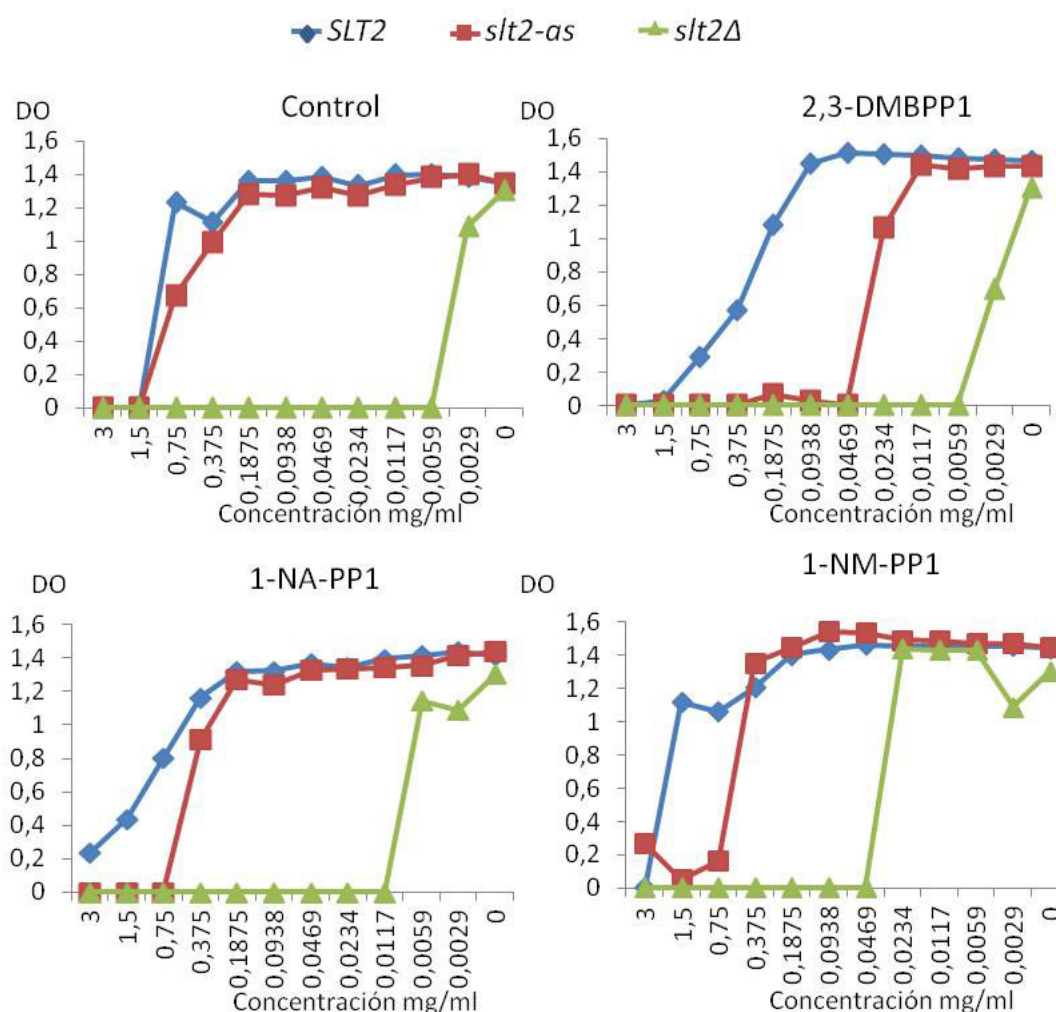


Figura 17: Estudio de la sensibilidad a rojo Congo en presencia de distintos inhibidores de *slt2-as*. Efecto de la inhibición de la MAPK de la ruta CWI activada con rojo Congo en presencia de distintos inhibidores en el mutante *slt2Δ* (Y00993) transformado con los plásmidos pRS316, pRS316-SLT2 o pRS316-*slt2-as*. La concentración de los distintos inhibidores es de 20μM y las de rojo Congo son en mg/ml. Los datos se tomaron a las 48 horas de incubación a 30°C.

En la Figura 18 se muestra la sensibilidad a rojo Congo de estos mismos transformantes en presencia de distintas concentraciones de 2,3-DMBPP1 y observamos cómo la inhibición de *slt2-as* es dependiente de la concentración de este análogo de ATP, ya que la cepa que expresa este alelo muestra mayor sensibilidad a rojo Congo al incrementar la cantidad de éste. Además podemos ver cómo, aunque la CMI de rojo Congo en presencia del inhibidor en las células que expresan *slt2-as* es mucho menor que la correspondiente a la de la versión silvestre, la inhibición de Slt2-as no llega a ser total ya que no se alcanza la concentración mínima inhibitoria que se observa para el mutante *slt2Δ*.

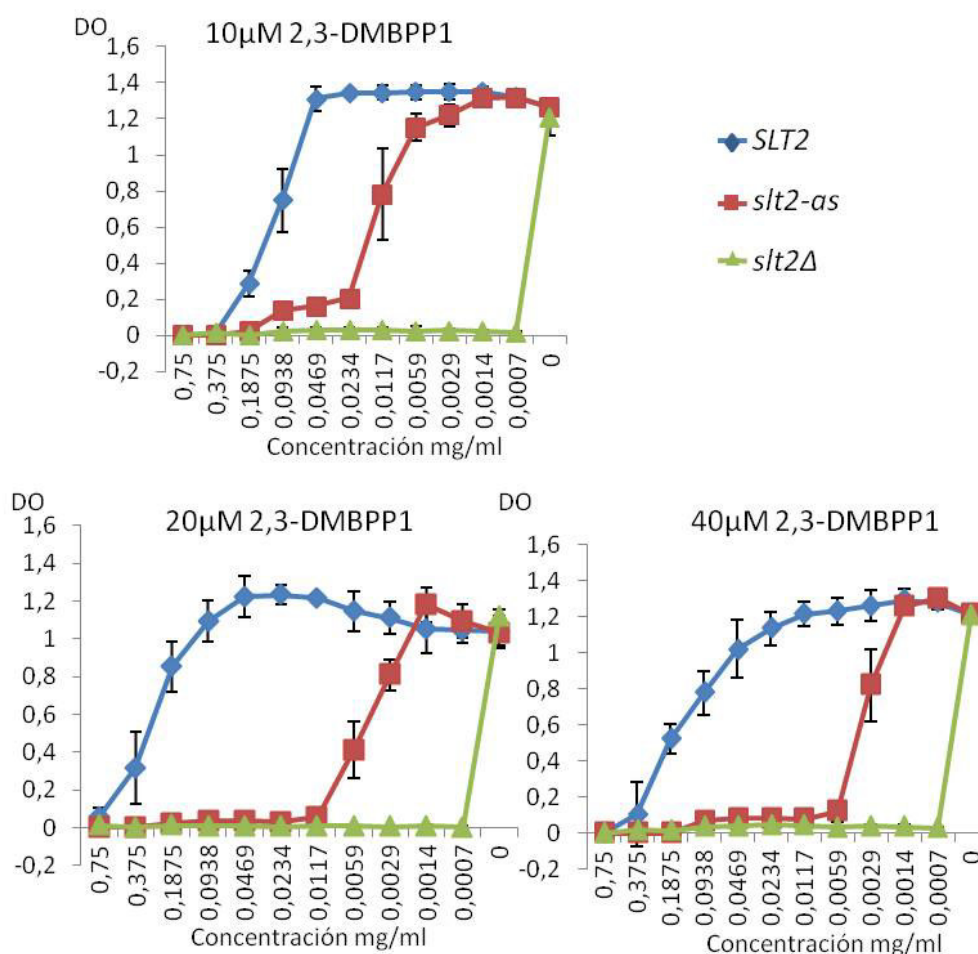


Figura 18: Estudio de la sensibilidad a rojo Congo en presencia de distintas concentraciones de 2,3-DMBPP1. Gráficas mostrando el efecto de la inhibición de la MAPK de la ruta CWI activada con rojo Congo en presencia de distintas concentraciones del inhibidor 2,3-DMBPP1 en el mutante *slt2Δ* (Y00993) transformado con los plásmidos pRS316, pRS316-*SLT2* o pRS316-*slt2-as*. Las concentraciones de rojo Congo son en mg/ml. Los datos se tomaron a las 48 horas de incubación a 30°C. Los datos representan la media de tres transformantes distintos y las barras de error la desviación estándar.

Para confirmar la inhibición de la actividad quinasa de *Slt2-as* por 2,3-DMBPP1, analizamos la activación del factor de transcripción Rlm1, el cual, en respuesta a un daño en la pared celular, experimenta un incremento en la cantidad y una reducción en la movilidad electroforética debido a su fosforilación por *Slt2* (Marín *et al.*, 2009). Como se observa en la Figura 19A, en presencia de rojo Congo, *Slt2-as* se comporta como una versión silvestre, pero al inhibirse su actividad quinasa como resultado del tratamiento con el análogo de ATP, se bloquea la activación de Rlm1, provocando la ausencia tanto de incremento en la cantidad como de cambio en la movilidad electroforética de este factor de transcripción a lo largo del tiempo. Además podemos afirmar que la falta de activación de Rlm1 por *Slt2-as* sólo se debe a la inhibición de la actividad quinasa de esta versión sensible a análogos y no a un defecto en la

activación de la ruta CWI ya que, en respuesta a rojo Congo, la fosforilación de la MAPK en la cepa que porta el alelo *slt2-as* es similar en ausencia y presencia de 2,3-DMBPP1. La activación de la ruta CWI la detectamos utilizando anticuerpos que reconocen la forma doblemente fosforilada y por tanto activada de Slt2.

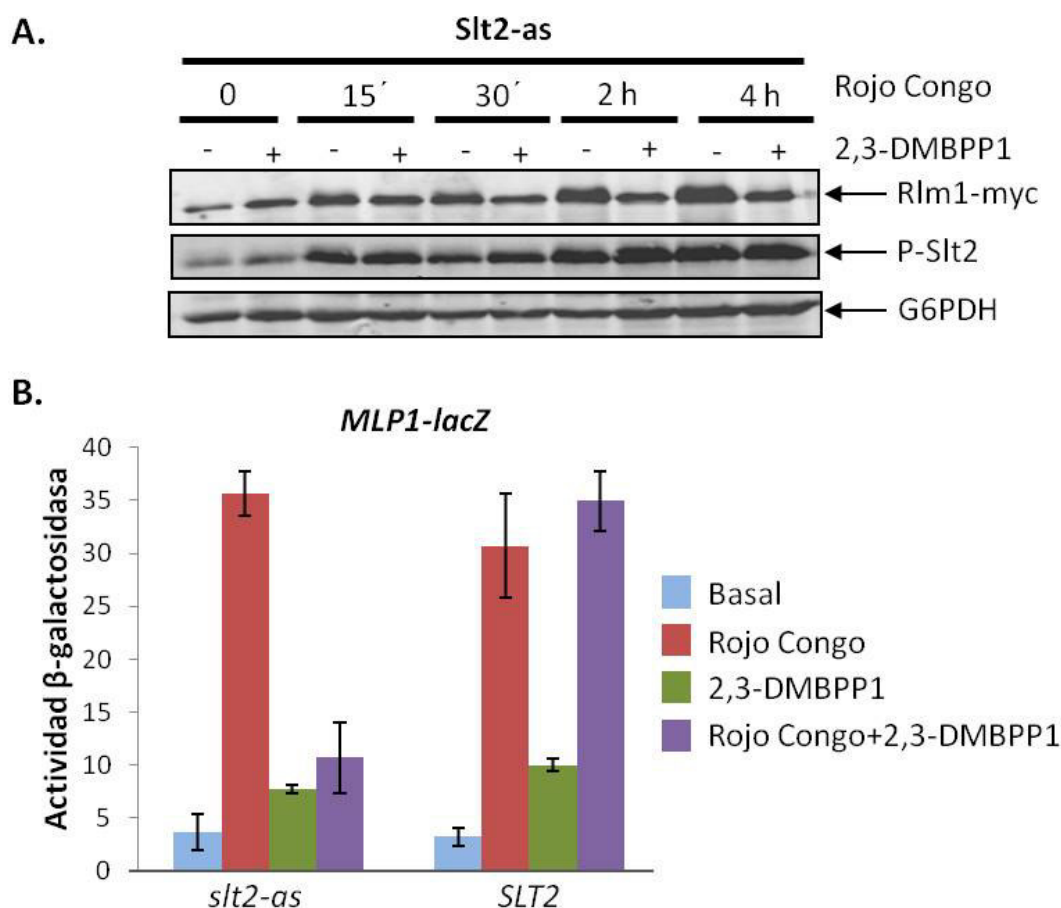


Figura 19: Análisis de la activación de Rlm1. **A.** Western blotting de los extractos de la cepa YMM1 (*slt2Δ* Rlm1-myc) transformada con pRS316-*slt2-as* para detectar la forma doblemente fosforilada de Slt2 y la movilidad electroforética de Rlm1-myc tras el tratamiento a 24°C con 30μg/ml de rojo Congo en ausencia o presencia de 2,3-DMBPP1 a 20μM. Rlm1-myc, Slt2 fosforilado y G6PDH (como control de carga) fueron detectados con anticuerpos anti-myc, anti-fosfo-p42/44 y anti-G6PDH. **B.** Ensayo de actividad β-galactosidasa en la cepa *slt2Δ* (Y00993) transformada con el plásmido anterior o pRS316-*SLT2* y expresando el gen reportero *lacZ* bajo el control del gen inducible *MLP1* (YEp352-*pMLP1-lacZ*). Las células fueron tratadas con 30μg/ml de rojo Congo y 20μM del análogo de ATP durante 4 horas a 24°C. Los datos muestran la expresión media de tres transformantes distintos y las barras de error, la desviación estándar.

Además estudiamos la inducción transcripcional de la ruta CWI utilizando el promotor de *MLP1*, uno de los genes que más se induce en condiciones de activación de la ruta de forma dependiente de Rlm1, dirigiendo la transcripción del gen reportero *lacZ*. En este caso comparamos la inducción de esta ruta en respuesta a rojo Congo en la cepa que expresa el alelo

slt2-as con respecto a la que lleva el gen silvestre de la MAPK. Observamos que, en ausencia del inhibidor, la activación de la transcripción dependiente de Slt2-*as* es similar a la que tiene lugar con la versión silvestre, y que el inhibidor reduce significativamente la inducción de la ruta CWI de manera específica en las células que expresan el alelo *slt2-as* (Figura 19B).

Todos estos resultados indican que el cambio del aminoácido de cadena larga por glicina en el bolsillo de unión a ATP de la MAPK de la ruta de integridad celular, genera una versión de Slt2 funcional y capaz de unir análogos voluminosos de ATP. Además, esta versión es inhibida catalíticamente de manera específica por estos análogos.

1.3. Estudio de mutantes sintéticos letales con *slt2Δ*

La caracterización de la función de Slt2, al igual que ocurre con otros tipos de proteínas quinasas, requiere realizar estudios de pérdida de su actividad mediante delección del gen o mediante mutaciones puntuales en el sitio catalítico de unión a ATP. En el caso de Slt2, ambas estrategias son posibles ya que las células siguen siendo viables en ausencia de estrés sobre la pared celular. Sin embargo, el mutante inactivo de Slt2 no es viable si se combina con la delección de diversos genes implicados en una gran variedad de procesos como la dinámica del citoesqueleto de actina, el ciclo celular o la biogénesis de la pared. Para poder estudiar la función de Slt2 en estos mutantes resulta de gran interés poder inhibir esta quinasa de manera selectiva, puntual y reversible. Por ello combinamos la mutación *slt2-as*, integrándola mediante reemplazamiento alélico, con la delección de distintos genes que presentan letalidad sintética con *slt2Δ*, tales como los genes que codifican las proteínas Gas1 (Tomishige *et al.*, 2003) y Fks1 (Cabib y Kang, 1987; Dijkgraaf *et al.*, 2002) implicadas en la biogénesis de la pared; Nbp2, adaptador de la fosfatasa Ptc1 que ejerce una regulación negativa de la ruta de respuesta a alta osmolaridad (HOG) y de la ruta CWI (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Hruby *et al.*, 2011; Tatjer *et al.*, 2016); el componente del “polarisoma” Spa2, relacionado con la organización del citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado (Sheu *et al.*, 1998; Shih *et al.*, 2005); Swi4, que activa la transcripción de genes implicados en la regulación del ciclo celular y del crecimiento polarizado (Nasmyth y Dirick, 1991; Baetz *et al.*, 2001); la quinasa dependiente de ciclina Pho85, responsable de la respuesta celular a niveles nutricionales (Timblin *et al.*, 1996; Carroll *et al.*, 2001); y Ppz1, una fosfatasa que regula el transporte de potasio y está implicada en la integridad celular y la progresión del ciclo celular (Clotet *et al.*, 1999; Yenush *et al.*, 2002).

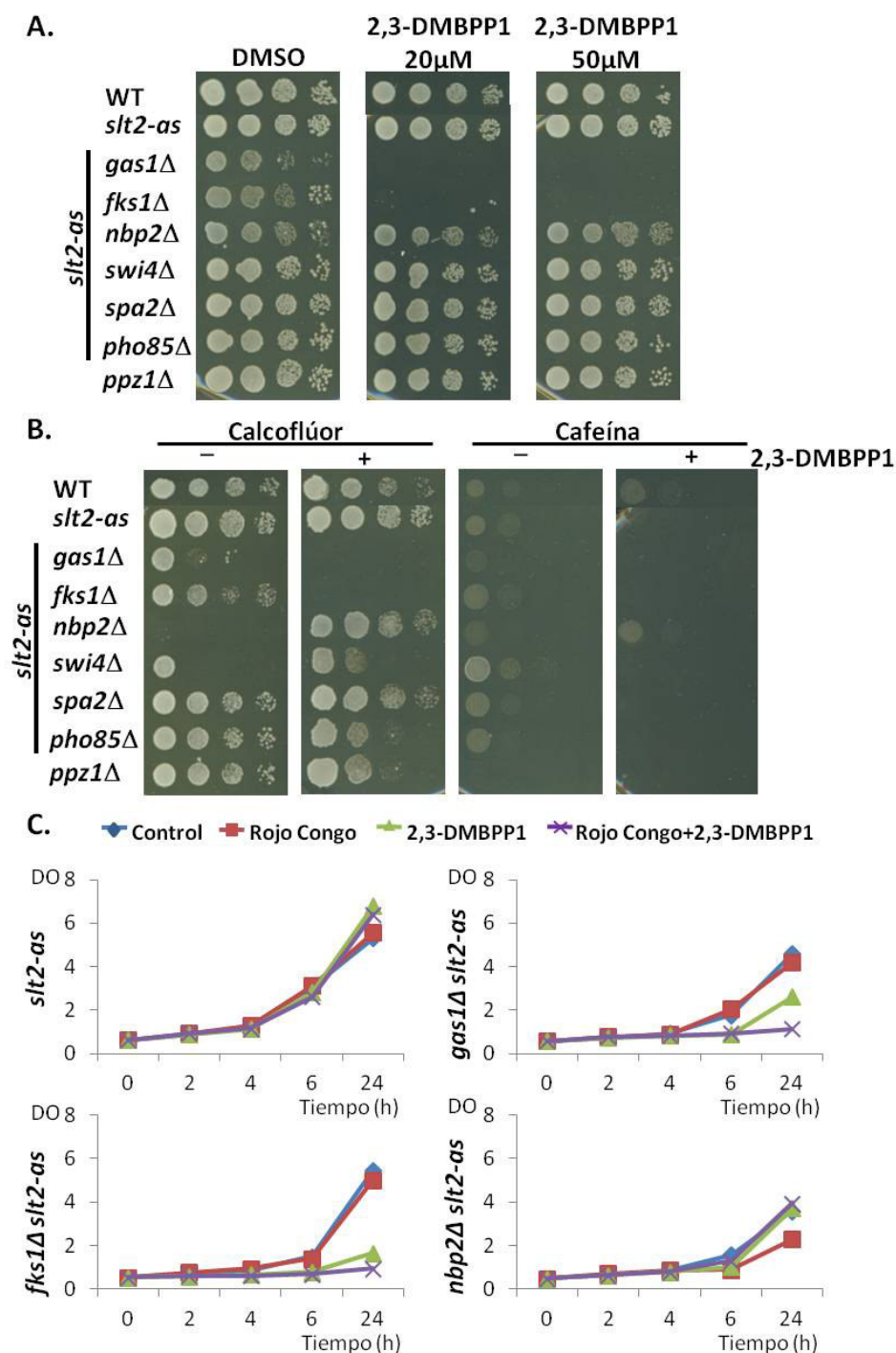


Figura 20: Estudio de la sensibilidad en mutantes dobles con *slt2-as*. **A.** Ensayo de crecimiento en gotas mediante diluciones decimales seriadas en placas de YPD suplementadas con DMSO o distintas concentraciones de 2,3-DMBPP1 de las cepas mutantes YASS-1 (*slt2-as*), YASS-2 (*gas1Δ slt2-as*), YASS-3 (*fks1Δ slt2-as*), YASS-4 (*nbp2Δ slt2-as*), YASS-5 (*swi4Δ slt2-as*), YASS-6 (*spa2Δ slt2-as*), YASS-7 (*pho85Δ slt2-as*), YASS-8 (*ppz1Δ slt2-as*) que presentan la versión de Slt2 sensible a análogos de ATP (*slt2-as*) integrada en el genoma y la isogénica silvestre YSTH1. **B.** Ensayo de diluciones seriadas con los mutantes anteriores en placas con DMSO al 0,1%, 10μg/ml de Calcoflúor, 10μg/ml de Calcoflúor más 20μM de 2,3 DMBPP1, 12mM de cafeína o 12mM de cafeína más 20μM de 2,3-DMBPP1. Tanto en A como en el B, las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas. **C.** Curvas de crecimiento en YPD y a 24°C de las cepas YASS-1 (*slt2-as*), YASS-2 (*gas1Δ slt2-as*), YASS-3 (*fks1Δ slt2-as*) e YASS-4 (*nbp2Δ slt2-as*) en ausencia o presencia de 20μM de inhibidor y tratadas o sin tratar con rojo Congo (30μg/ml). El crecimiento se determinó a las 2, 4, 6 y 24 horas mediante absorbancia a 600 nanómetros.

Mediante diluciones decimales seriadas estudiamos la viabilidad de estos dobles mutantes al inhibir la actividad enzimática de Slt2-as con 2,3-DMBPP1 y observamos que en ausencia de estrés sobre la pared celular, solo los dobles mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* muestran una dependencia total de Slt2 ya que, al bloquear la actividad de esta MAPK presentan inhibición completa del crecimiento (Figura 20A). Sin embargo, como se observa en la Figura 20B, cuando además del inhibidor sometemos a los dobles mutantes a un tratamiento con un compuesto activador de la ruta CWI como la cafeína (Martín *et al.*, 2000), vemos que la falta de actividad de Slt2 aumenta la sensibilidad a este compuesto en todos los casos excepto en el mutante *nbp2Δ slt2-as*, en el que disminuye. Cuando se realiza un tratamiento de dichos mutantes con blanco de Calcoflúor (Ketela *et al.*, 1999), otro compuesto activador de la ruta que daña la pared, a concentraciones bajas a las que el mutante *slt2-as* no es sensible en presencia del inhibidor, también se observa un aumento de sensibilidad cuando esta mutación se combina con la delección de *GAS1*, *FKS1*, *PHO85* o *PPZ1*, y se hace más resistente al combinarse con la delección de *SWI4* o *NBP2*. Esto demuestra que el requerimiento de Slt2 no es igual de esencial para estos mutantes, todos ellos previamente descritos como sintéticos letales con *slt2Δ*.

La resistencia a un daño en pared observada en el mutante *nbp2Δ slt2-as* como resultado de la inhibición de Slt2 fue analizada mediante curvas de crecimiento en respuesta a rojo Congo en ausencia y presencia del inhibidor. Además se comparó el comportamiento de esta cepa con los mutantes *slt2-as*, *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as*, confirmándose la resistencia a estrés de pared observada en el mutante *nbp2Δ slt2-as* y la inhibición del crecimiento en *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* como resultado del bloqueo de la actividad catalítica de Slt2 (Figura 20C).

1.3.1 Estudio de la inhibición de Slt2 en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as*

1.3.1.1. La inhibición de Slt2 en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* provoca un incremento en el porcentaje de células con yemas pequeñas.

Gas1 y Fks1 son dos proteínas que intervienen en la biosíntesis del glucano de la pared celular ya que Gas1 es una β -1,3-glucanosiltransferasa implicada en la elongación y ramificación de las cadenas de β -1,3 glucano (Lagorce *et al.*, 2003; Ragni *et al.*, 2007) y Fks1 es la subunidad catalítica de la β -1,3-glucan sintasa (Cabib y Kang, 1987; Dijkgraaf *et al.*, 2002). Debido a que ambos mutantes son sintéticos letales con *slt2Δ* y muestran una dependencia total de la ruta CWI, decidimos estudiar su morfología. Observamos cómo la inhibición de la actividad de Slt2 en mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* provoca un incremento en el porcentaje de células que presentan yemas pequeñas, que pasa de alrededor del 20% en ausencia del inhibidor hasta un

70-80% en su presencia, mientras que en el mutante sencillo *slt2-as*, es menor del 20% independientemente del tratamiento con el inhibidor (Figura 21).

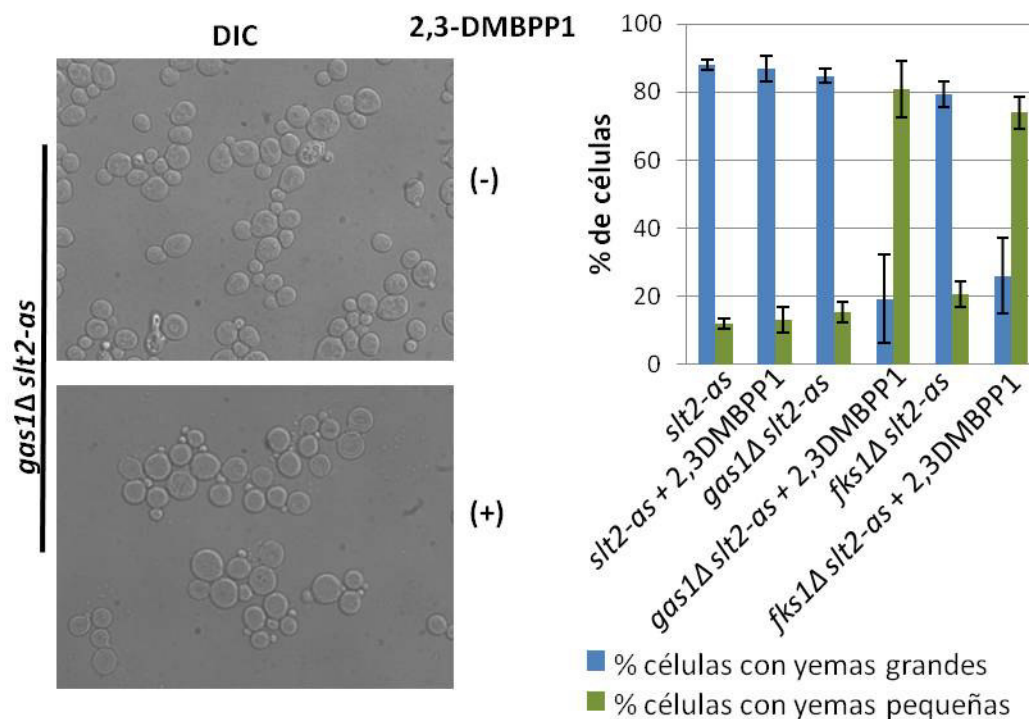


Figura 21: Análisis morfológico para estudiar la inhibición de *slt2-as*. Imágenes de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) del mutante YASS-2 (*gas1Δ slt2-as*) tomadas a las 3 horas en ausencia y presencia de 20μM del análogo de ATP. **B.** La gráfica muestra el porcentaje de células con yemas grandes o pequeñas en las cepas YASS-1 (*slt2-as*), YASS-2 (*gas1Δ slt2-as*) e YASS-3 (*fks1Δ slt2-as*) tratadas o sin tratar con 2,3-DMBPP1 durante 3 horas a 30°C. Los datos representan los recuentos de 100 células de estos cultivos realizados por triplicado y las barras, la desviación estándar.

Tanto Fks1 como Gas1 están relacionadas con el proceso de gemación ya que Fks1 se localiza en el cuello durante la formación del septo primario (Mazur y Baginsky, 1996; Qadota *et al.*, 1996), y se ha descrito la asociación de Gas1 a la quitina del septo contribuyendo al tamaño del cuello y a la separación celular (Rolli *et al.*, 2009). Debido a esto y junto con el hecho de que Slt2 se localiza en sitios de crecimiento polarizado (van Drogen y Peter, 2002), nos planteamos estudiar el efecto de la inhibición de Slt2 en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* en relación a la morfogénesis de la yema y la citoquinesis. Así, analizamos en estos mutantes el citoesqueleto de actina, el anillo de miosina, el anillo de septinas y la localización de componentes de la ruta CWI.

1.3.1.2. El citoesqueleto de actina no está alterado en las cepas *slt2-as*, *gas1Δ slt2-as* o *fks1Δ slt2-as* tras la inhibición de Slt2

Debido a que la ruta CWI es necesaria para la repolarización del citoesqueleto de actina como resultado de un estrés de pared (Delley y Hall, 1999) y que en casos de despolarización del citoesqueleto se activa Slt2 (Harrison *et al.*, 2001; Krause y Gray, 2002; Torres *et al.*, 2002), comenzamos analizando el efecto de la inhibición de Slt2 en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* sobre los parches de actina. Para ello realizamos la tinción de las células con rodamina-faloidina, en ausencia o presencia del inhibidor. Como se observa en la Figura 22, en todas las cepas la actina localiza de forma polarizada en las yemas en emergencia y la falta de actividad Slt2 no provoca ninguna alteración significativa ni en los dobles mutantes ni en el mutante sencillo *slt2-as*.

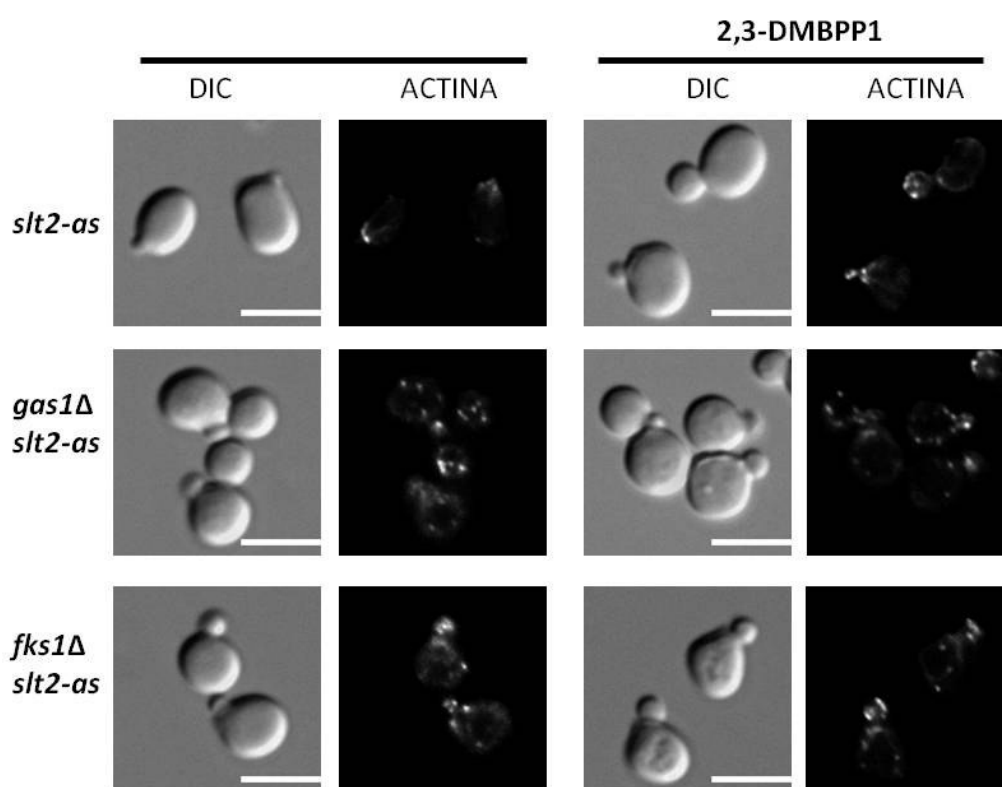


Figura 22: Visualización del citoesqueleto de actina en los mutantes *slt2-as* (YASS-1), *gas1Δ slt2-as* (YASS-2) o *fks1Δ slt2-as* (YASS-3). Imágenes de DIC y microscopía de fluorescencia de las cepas mencionadas anteriormente en ausencia o presencia de 20μM de inhibidor durante 3 horas a 30°C. Para marcar los parches de actinas las células fueron teñidas con faloidina fusionada a rodamina.

1.3.1.3. La inhibición de *Slt2* no altera la localización del anillo de miosina en los mutantes *slt2-as* o *gas1Δ slt2-as*

Un componente esencial del anillo de miosina es Myo1, una miosina de cadena pesada tipo II que junto con la actina forma el anillo contráctil y cuya delección es letal para la levadura (Lippincott y Li, 1998). Estudiamos la localización de Myo1 fusionada a la proteína fluorescente mCherry y observamos que la inhibición de *Slt2* no conduce a ninguna diferencia en la localización de esta proteína con respecto a las células sin tratar con el inhibidor, ni en el mutante *gas1Δ slt2-as* ni en la cepa *slt2-as*. En todos los casos la miosina se observa localizada en el cuello de las yemas (Figura 23).

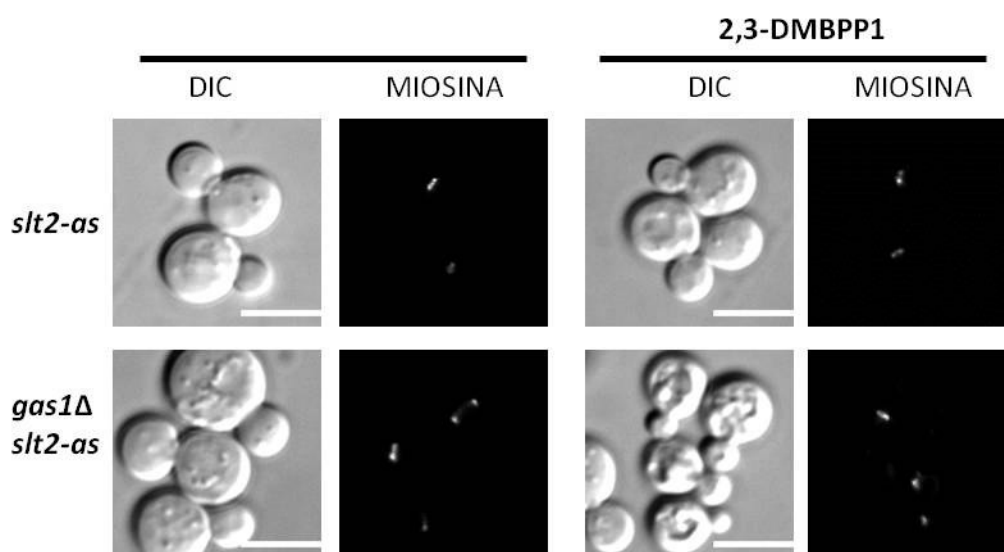


Figura 23: Estudio de la localización del anillo de miosina en los mutantes *slt2-as* Myo1-mCherry (YES2) y *gas1Δ slt2-as* Myo1-mCherry (YES3). Imágenes representativas de DIC y microscopía de fluorescencia de las cepas mencionadas anteriormente tratadas o sin tratar con 20μM de inhibidor durante 3 horas a 30°C.

1.3.1.4. La pérdida de actividad de *Slt2* altera la localización de la septina *Cdc10* en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as*

Por último estudiamos la localización de algunas septinas. De las 5 septinas identificadas en *S. cerevisiae* durante el crecimiento vegetativo, analizamos la localización de *Cdc3* y *Cdc10* mediante la fusión de éstas a las proteínas fluorescente mCherry y GFP, respectivamente. Como se muestra en las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 24), en una cepa que presenta únicamente la versión *slt2-as*, ambas septinas se localizan correctamente en el cuello entre la célula madre y la hija o en el ápice de la yema en emergencia, en ausencia y presencia del inhibidor, al igual que ocurre en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* sin inhibidor. Pero cuando en estos dobles mutantes se inhibe la MAPK *Slt2*, observamos cómo, aunque *Cdc3*

permanece en el anillo, el cual parece ensamblarse correctamente, Cdc10 aparece deslocalizada por toda la célula.

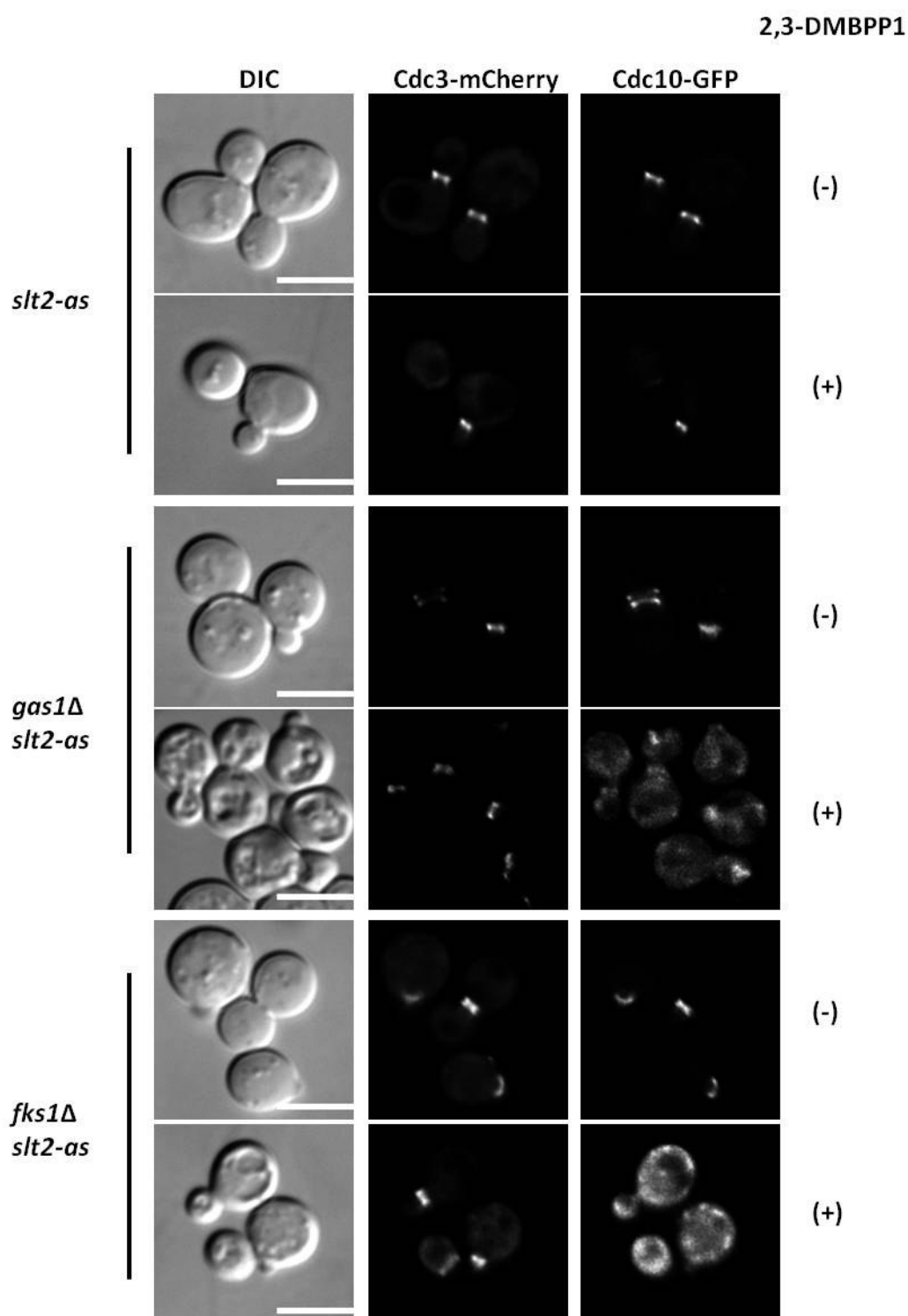


Figura 24: Visualización del anillo de septinas en los mutantes *slt2-as* (YASS-1), *gas1Δ slt2-as* (YASS-2) y *fks1Δ slt2-as* (YASS-3). Imágenes de DIC y microscopía de fluorescencia de las cepas indicadas en la figura transformadas simultáneamente con los plásmidos IPL211-*CDC3*-mCherry y pLA10H-*CDC10*-GFP. Las células se cultivaron a 30°C en presencia y ausencia de 20μM de 2,3-DMBPP1.

1.3.1.5. En los mutantes *nbp2Δ slt2-as*, *swi4Δ slt2-as*, *pho85Δ slt2-as* y *ppz1Δ slt2-as* la inhibición de Slt2 no altera la localización de Cdc10.

Además analizamos la localización de Cdc10-GFP en el resto de los mutantes estudiados anteriormente que presentaban letalidad sintética con Slt2 cuando se inhibía la actividad de Slt2 en presencia de cafeína o Calcoflúor y comprobamos que la deslocalización de Cdc10 no se observa en ninguno de estos mutantes tratados durante 3 horas con 20μM de 2,3-DMBPP1 (Figura 25), ya que en todos los casos Cdc10 se localiza en el cuello de la yemas.

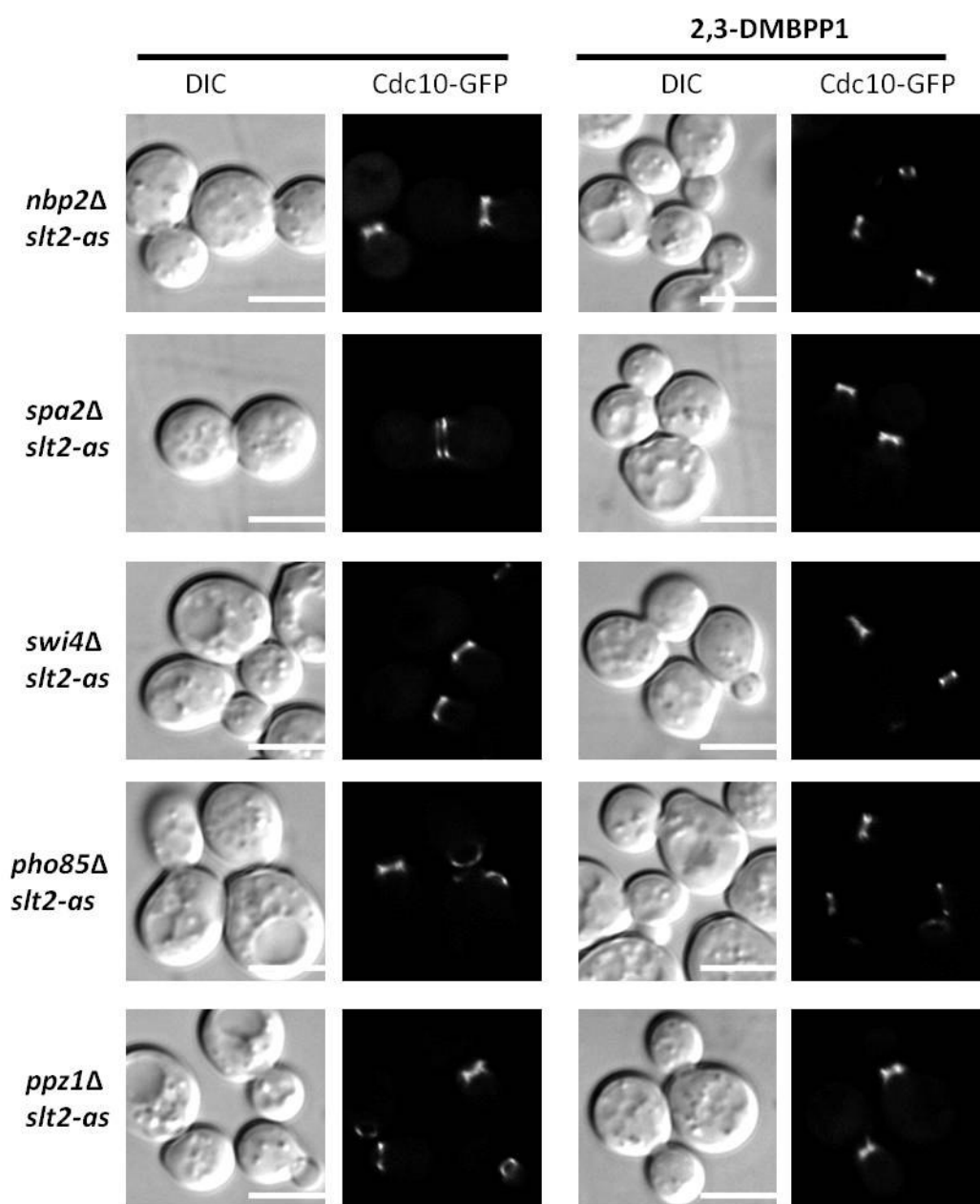


Figura 25: Visualización del anillo de septinas en los dobles mutantes *nbp2Δ slt2-as* (YAS-4), *swi4Δ slt2-as* (YASS-5), *spa2Δ slt2-as* (YASS-6), *pho85Δ slt2-as* (YASS-7) y *ppz1Δ slt2-as* (YASS-8). Localización de Cdc10-GFP expresado en el plásmido pLA10H en las cepas indicadas, tratadas o sin tratar durante 3 horas con 20μM de 2,3-DMBPP1.

1.3.1.6. *Pkc1* y *Wsc1* no presentan alterada su localización en mutantes *slt2-as*, *gas1Δ* *slt2-as* o *fks1Δ* *slt2-as* tras inhibir la actividad catalítica de *Slt2*

Por otro lado *Pkc1*, al igual que *Rho1*, se localiza en sitios de crecimiento polarizado, tanto durante la emergencia de la yema (Andrews y Stark, 2000) como durante la citokinesis, situándose en el cuello entre la célula madre y la hija o en el ápice de la yema en emergencia, de forma dependiente de la integridad del anillo de septinas (Denis y Cyert, 2005). Al analizar la localización de *Pkc1* marcada con mCherry en los mutantes *slt2-as* y *gas1Δ* *slt2-as*, no observamos ninguna alteración cuando inhibimos la actividad MAPK de la ruta CWI (Figura 26).

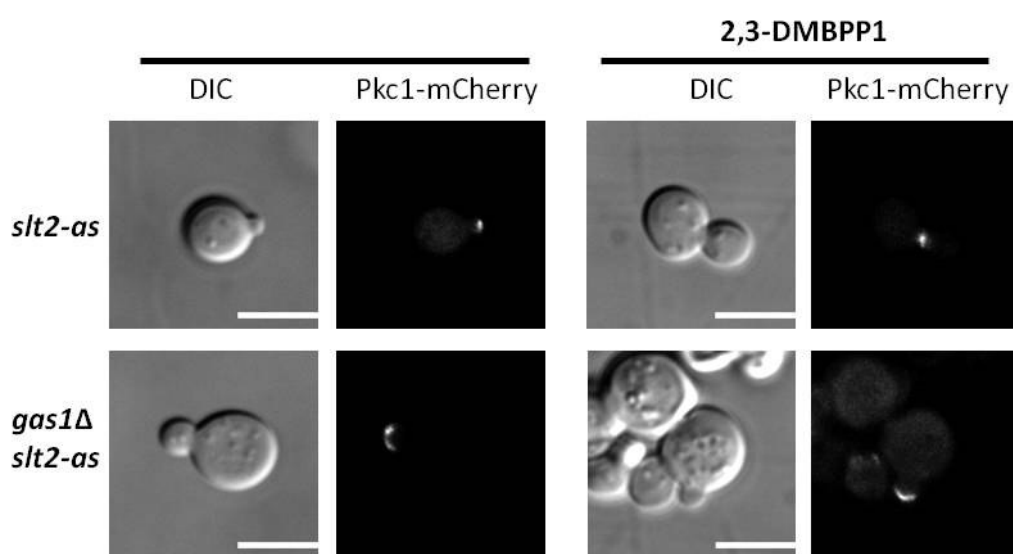


Figura 26: Estudio de la localización de *Pkc1* en los mutantes *slt2-as* (YASS-1) y *gas1Δ* *slt2-as* (YASS-2). Imágenes de DIC y microscopía de fluorescencia de las cepas indicadas en la figura que expresan la fusión *Pkc1*-mCherry en el plásmido pVD67 tratadas o sin tratar durante 3 horas con 20μM del inhibidor de MAPK sensible a análogos de ATP.

Otro de los componentes de esta ruta que también se localiza en sitios de crecimiento polarizado es el sensor *Wsc1* (Delley y Hall, 1999; Straede y Heinisch, 2007). Como se observa en la Figura 27, *Wsc1*-GFP sigue localizándose en el ápice o en el cuello de la yema en los mutantes *gas1Δ* *slt2-as* y *fks1Δ* *slt2-as* tras el tratamiento con el inhibidor de *Slt2*-as.

Con todo esto podemos concluir que la inhibición de la actividad enzimática de *Slt2* en combinación con la falta de las proteínas responsables de la síntesis y maduración del β-1,3 glucano de la pared celular *Gas1* y *Fks1*, provoca una deslocalización de la septina *Cdc10* y un incremento en el número de células con yemas pequeñas pero sin afectar a la localización de la septina *Cdc3* ni de componentes de la ruta CWI como *Pkc1* y *Wsc1*.

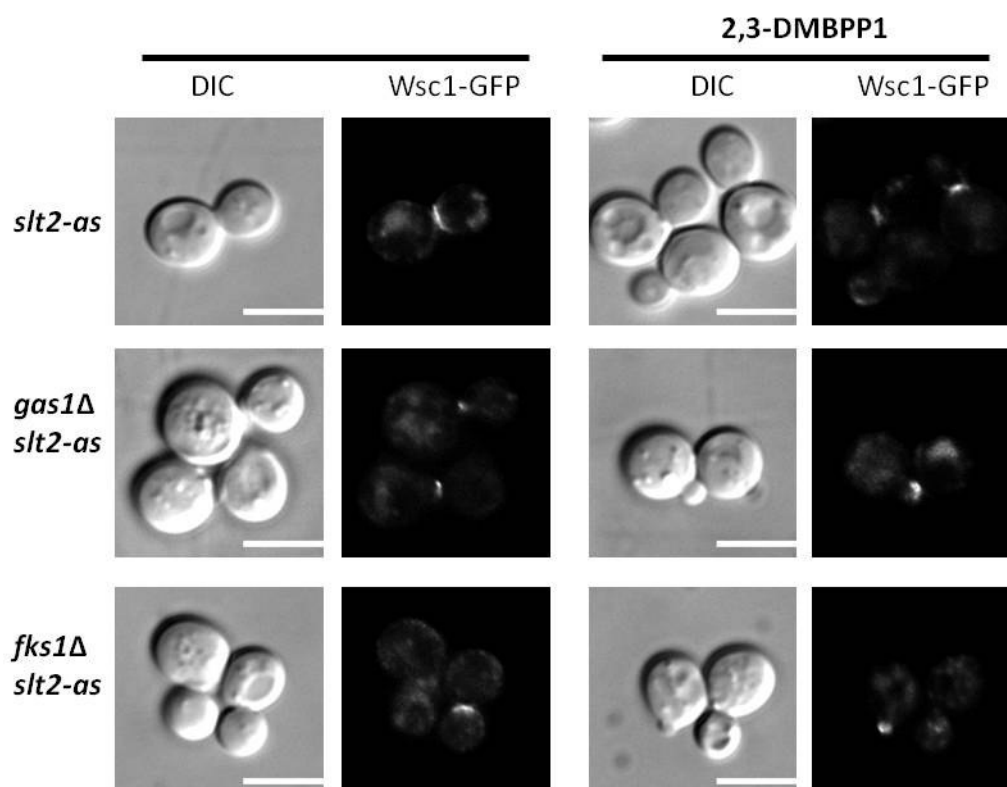


Figura 27: Estudio de la localización de Wsc1 en los mutantes *slt2-as Wsc1-GFP* (YES4), *gas1Δ slt2-as Wsc1-GFP* (YES5) y *fks1Δ slt2-as Wsc1-GFP* (YES6). Imágenes de DIC y microscopía de fluorescencia de las cepas indicadas en la figura sin tratar o tratadas durante 3 horas con 20μM del inhibidor.

1.4 Utilización de la versión de Slt2 sensible a análogos de inhibidores de quinasas para identificar sustratos de esta MAPK

1.4.1. GST-Slt2-as es funcional y capaz de utilizar análogos de inhibidores de quinasas

Como ya hemos comentado anteriormente, otra de las aplicaciones de estas versiones de proteínas quinasas sensibles a análogos de ATP es la identificación de sustratos de estas quinasas, ya que la modificación del bolsillo catalítico también les permite unir análogos voluminosos de ATP que tienen sustituido el Y-fosfato por tiofosfato y transferir este tiofosfato a las proteínas sobre las que actúan en reacciones quínasa *in vitro*. El tratamiento de las proteínas tiofosforiladas con un agente alquilante para residuos tioles genera el correspondiente éster tiofosfato que posteriormente puede ser inmunodetectado con anticuerpos específicos (Hertz *et al.*, 2010). Estos análogos de ATP no pueden ser reconocidos por otras quinasas, ya que sólo la quinasa modificada es capaz de llevar a cabo esta reacción, por lo que cualquier proteína que aparezca tiofosforilada será el resultado de la reacción catalizada por dicha quinasa-as.

Para obtener una cantidad elevada de la quinasa sensible a análogos de ATP para el ensayo enzimático, procedimos a sobreexpresar Slt2-as en *S. cerevisiae*. Así mismo, en este tipo de ensayos, es necesario purificar la enzima de los extractos proteicos, por lo que clonamos el alelo *slt2-as* en el plásmido episómico pEG(KG) fusionado a GST y bajo el control del promotor inducible por galactosa *GAL1*. Mediante ensayos de actividad β -galactosidasa comparamos la activación transcripcional de la ruta CWI en respuesta a un daño en la pared en células expresando *MLP1-lacZ* junto con GST-Slt2-as o la versión silvestre GST-Slt2 expresadas desde el mismo plásmido. Así observamos cómo la fusión a GST y la sobreexpresión no reducen la actividad de Slt2-as, que es incluso superior a la que muestra Slt2 silvestre en condiciones de estimulación con rojo Congo, ni tampoco afectan a su inhibición selectiva por 2,3-DMBPP1 (Figura 28).

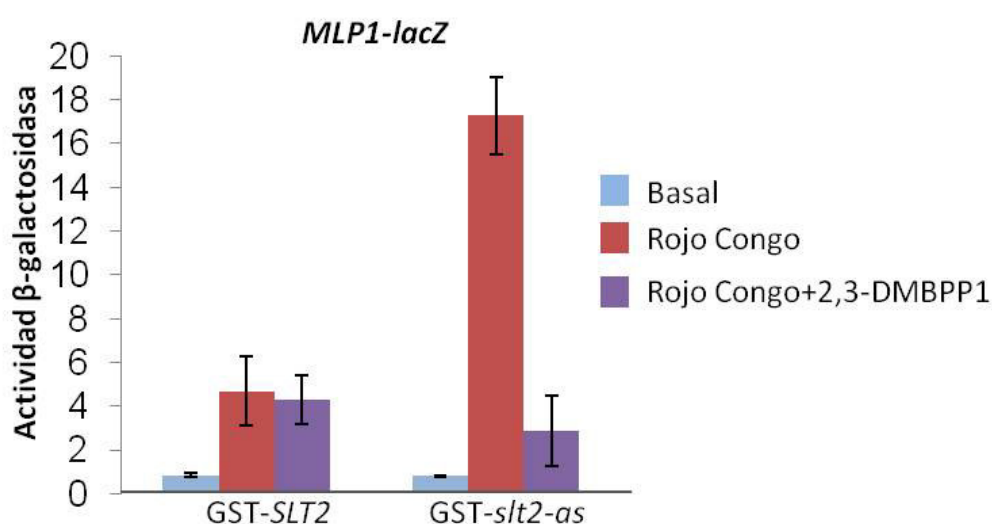


Figura 28: Análisis transcripcional de la activación de la ruta CWI y estudio de la inhibición de *slt2-as* tras el tratamiento con 2,3-DBMPP1. Ensayo de actividad β -galactosidasa en la cepa *slt2Δ* (Y00993) transformada con los plásmido pEG(KG)-GST-SLT2 o pEG(KG)-GST-*slt2-as* y expresando el gen reportero *lacZ* bajo el control del gen inducible *MLP1* (YEp352-*pMLP1-lacZ*). Las células tratadas o sin tratar con 30 μ g/ml de rojo Congo fueron cultivadas durante 4 horas a 24°C y el análogo de ATP (20 μ M) se añadió 15 minutos después del inicio del tratamiento con rojo Congo. Los datos muestran la expresión media de tres transformantes distintos y las barras de error, la desviación estándar.

1.4.2. GST-Slt2-as tiofosforila *in vitro* las proteínas Rlm1 y Msg5

Una vez que confirmamos que la proteína Slt2-as así producida era funcional e inhibible por análogos voluminosos de inhibidores de quinasas, procedimos a comprobar si era capaz de utilizar N⁶-(feniletil)-ATP-γ-S para tiofosforilar sustratos. Para ello realizamos ensayos quinasa *in vitro* utilizando GST-Slt2-as purificada de extractos proteicos de cultivos celulares de *S. cerevisiae* tratados con rojo Congo para tener la quinasa en su forma activa, N⁶-(feniletil)-ATP-γ-S y extractos de *E. coli* expresando la proteína recombinante GST-Rlm1 como sustrato conocido de Slt2 (Jung *et al.*, 2002). La fusión de estas proteínas a GST permite su identificación y la determinación de la cantidad expresada mediante inmunodetección. Observamos que esta versión de Slt2 es capaz de tiofosforilar a este factor de transcripción de la ruta CWI con alta especificidad, ya que esta proteína no se observa tiofosforilada cuando se utiliza solo GST (Figura 29). En el ensayo con GST se detectaron algunas bandas, aunque muy tenues, correspondientes a otras proteínas presumiblemente tiofosforiladas, lo que indica que existe, aunque en mucha menor medida, cierta utilización de este análogo de ATP por parte de otras posibles quinasas que quedan retenidas inespecíficamente en las columnas con glutatión o bien existentes en los extractos proteicos de *E. coli*.

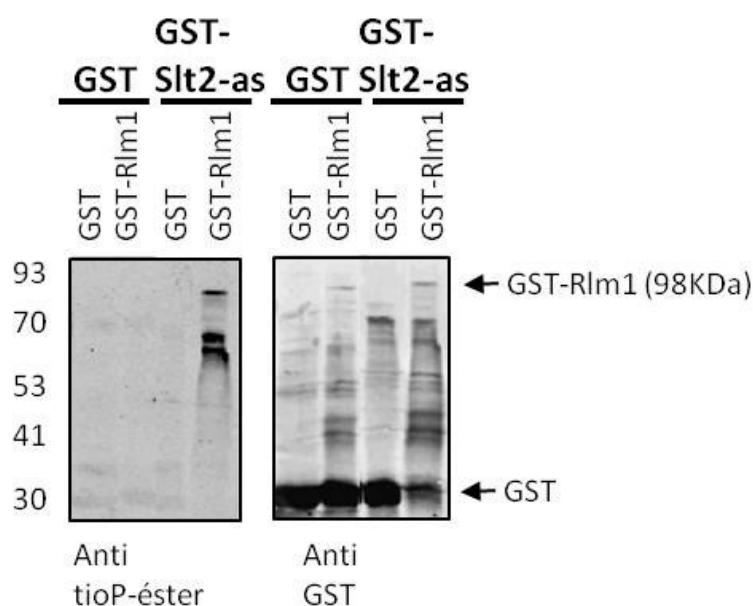


Figura 29: Ensayo proteína quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre GST-Rlm1 producida en *E. coli*. Análisis mediante *Western blotting* de ensayo quinasa realizado con GST o GST-Slt2-as purificado por afinidad con una matriz de Glutathione Sepharose a partir de los extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con pEG(KG) o PEG(KG)-*slt2-as* y tratada durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo en YPG. Como sustratos de Slt2 se utilizaron los extractos totales de GST (pGEX(KG)) o GST-Rlm1 (pGEX(KG)-*RLM1*) expresados en cepa Rosetta de *E. coli*. Para detectar los sustratos tiofosforilados se utilizó el anticuerpo anti-tiofosfato éster y el anticuerpo anti-GST como control.

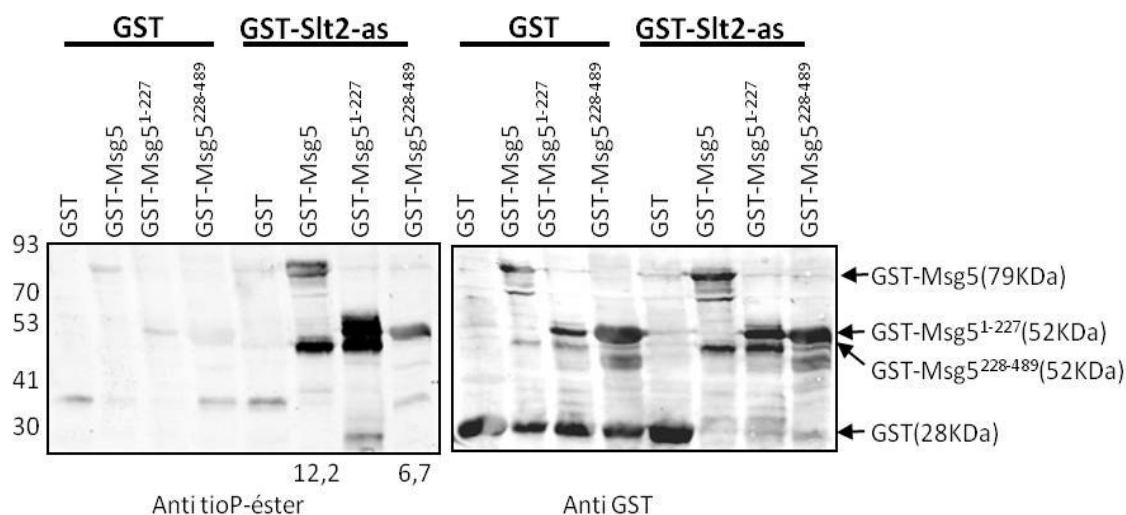


Figura 30: Ensayo proteína quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre GST-Msg5 producida en *E. coli*. Análisis mediante *Western blotting* de ensayo quinasa realizado con GST o GST-Slt2-as purificado por afinidad con una matriz de Glutathione (*Glutathione Sepharose*) a partir de los extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con pEG(KG) o PEG(KG)-*slt2-as* y tratada durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo en YPG. Como sustratos de Slt2 se utilizaron los extractos totales de GST, GST-Msg5, GST-Msg5¹⁻²²⁷ y GST-Msg5²²⁸⁻⁴⁸⁹ expresados en pGEX(KG) en *E. coli*. Todas estas versiones de Msg5 presentan la mutación C319A de pérdida de actividad fosfatasa. Para detectar los sustratos tiofosforilados se utilizó el anticuerpo anti-tiofosfato éster y el anticuerpo anti-GST como control. Los números que aparecen debajo del panel indican los niveles de tiofosforilación de GST-Msg5 y GST-Msg5²²⁸⁻⁴⁸⁹ con respecto a la tiofosforilación observada en ausencia de Slt2-as (valor 1).

Otro sustrato conocido de Slt2 del cual también estudiamos la fosforilación por parte de Slt2-as en estos ensayos quinasa fue la fosfatasa de especificidad dual Msg5, la cual controla la ruta CWI por desfosforilación de Slt2 y a su vez es fosforilada por esta MAPK (Flández *et al.*, 2004). En este caso trabajamos con una versión de Msg5 que tenía mutado el residuo cisteína 319 a alanina y por lo tanto carecía de actividad fosfatasa, para impedir una posible autodesfosforilación de esta proteína y la desfosforilación *in vitro* de Slt2-as (Flández *et al.*, 2004). Además, debido a que esta fosfatasa presenta 14 residuos S/TP susceptibles de fosforilación por MAPKs (Mok *et al.*, 2010) repartidos en las regiones amino-terminal (9 residuos S/TP: Ser22, Ser49, Ser62, Thr64, Ser85, Thr89, Ser115, Ser135, Thr178) y carboxilo-terminal (5 residuos S/TP: Ser357, Ser377, Ser422, Thr434, Thr437), analizamos en qué fragmento se producía la fosforilación de esta proteína. Así expresamos en *E. coli* tanto la versión completa de Msg5 como la parte amino (1-227) o carboxilo (228-489), en fusión a GST, para utilizarlas como sustrato en los ensayos quinasa. En la Figura 30, se observa que tanto Msg5 completa como ambas regiones son tiofosforiladas por Slt2-as, si bien es superior la intensidad sobre el fragmento amino-terminal.

Por otro lado, quisimos saber si esta versión de Slt2 sensible a análogos de ATP también era capaz de tiofosforilar a sus sustratos en extractos proteicos de *S. cerevisiae* y si la copia silvestre

de Slt2 presente en dichos extractos interfería o no en el ensayo. Para tener una alta cantidad de sustrato en fusión a una etiqueta que permitiera su detección, sobreexpresamos GST-Msg5 desde un vector episómico bajo el control del promotor inducible por galactosa y observamos, como se muestra en la Figura 31, que Slt2-as tiofosforila este sustrato de manera específica ya que no se observa ninguna banda correspondiente a GST-Msg5 tiofosforilada en los ensayos con GST. Además comprobamos la necesidad de inducir la sobreexpresión de los sustratos para poder identificar la tiofosforilación por parte de Slt2-as, ya que cuando se utilizó el extractos proteico de levadura donde sólo se sobreexpresó GST y en los que estaba presente la versión silvestre de Msg5 expresada desde su propio *locus* cromosómico, no se observó ninguna banda a altura de Msg5.

Todos estos resultados demuestran que la versión de Slt2 sensible a análogos de ATP es capaz de aceptar N⁶-(feniletil)-ATP-γ-S en su sitio activo para tiofosforilar con alta especificidad sustratos conocidos de esta MAPK sobreexpresados tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae*.

1.4.3. Identificación de nuevos sustratos de Slt2

En un trabajo anterior de fosfoproteómica cuantitativa mediante SILAC, desarrollado por nuestro grupo de investigación, se identificaron 24 posibles sustratos de Slt2, ya que aparecían más fosforilados en condiciones de estimulación de la ruta CWI, utilizando una versión hiperactiva de Pkc1, que en las condiciones control sin estimular y, además, presentaban residuos consenso S/TP susceptibles de fosforilación por MAPKs (Mascaraque *et al.*, 2013). Utilizando la versión GST-Slt2-as decidimos estudiar mediante ensayos quinasa *in vitro* si tenía lugar la fosforilación directa sobre algunos de estos posibles sustratos expresados tanto en *S. cerevisiae* como en *E. coli*. Para la expresión en levadura, utilizamos aquellas proteínas que estaban presentes en la colección de sobreexpresión de proteínas fusionadas a GST de *Open Biosystems*. Así probamos Pkc1, Zeo1 y Rcn2, implicadas en señalización celular; componentes de los eisosomas, como Seg1, Pil1, Lsp1 y Pst2; Pfk2 (fosfofructoquinasa 2), implicada en el metabolismo de carbohidratos; Lpp1, una fosfatasa de fosfolípidos; la superóxido dismutasa Sod1, relacionada con la destoxificación y estrés oxidativo; Rnr4, que participa en la reparación del DNA; la proteína Pup2, responsable de ubiquitinación; Gga1, relacionada con la endocitosis y secreción; Caf20, implicada en síntesis proteica; y la proteína del poro nuclear, Nup159. Además, en todos los ensayos quinasa incluimos como control positivo GST-Msg5 o GST-Mkk1 expresadas en el mismo plásmido que las proteínas anteriores. Mkk1 es otro de los sustratos conocidos de Slt2, ya que se ha descrito que Slt2 ejerce una retrofosforilación sobre las MAPKs Mkk1 y Mkk2 en condiciones de activación de la ruta (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007).

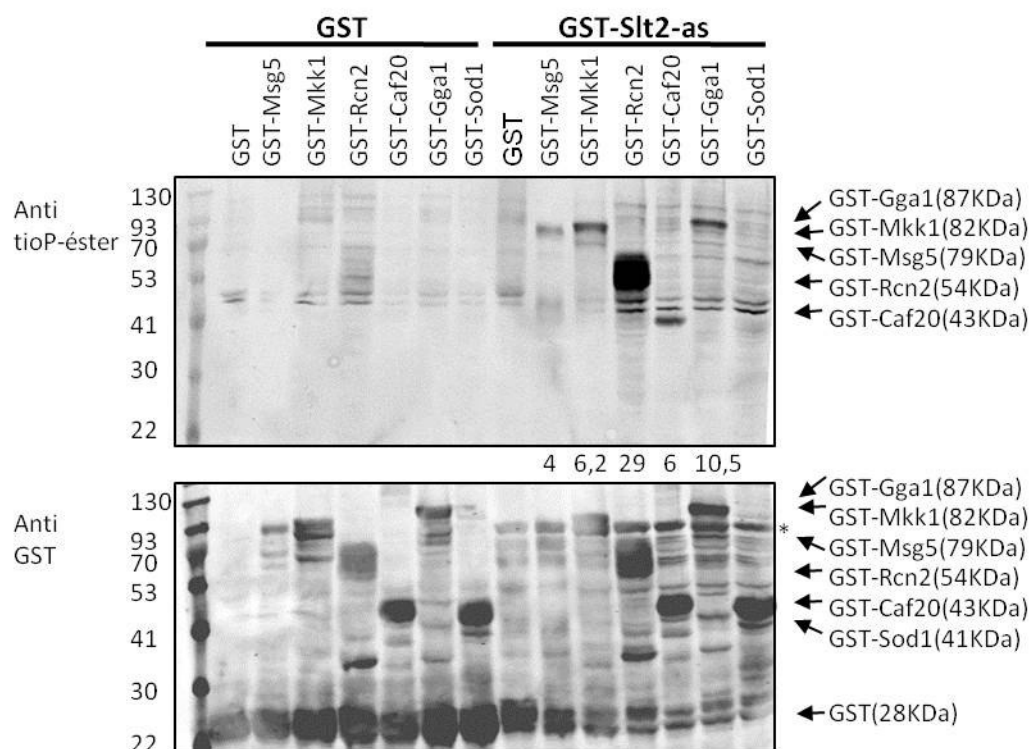
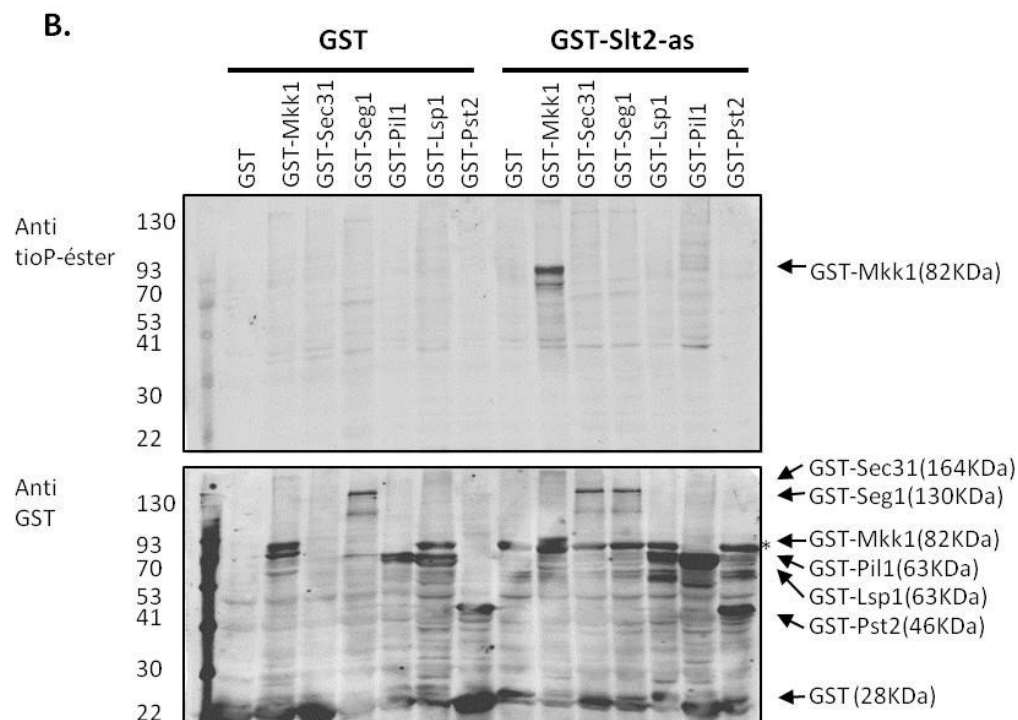
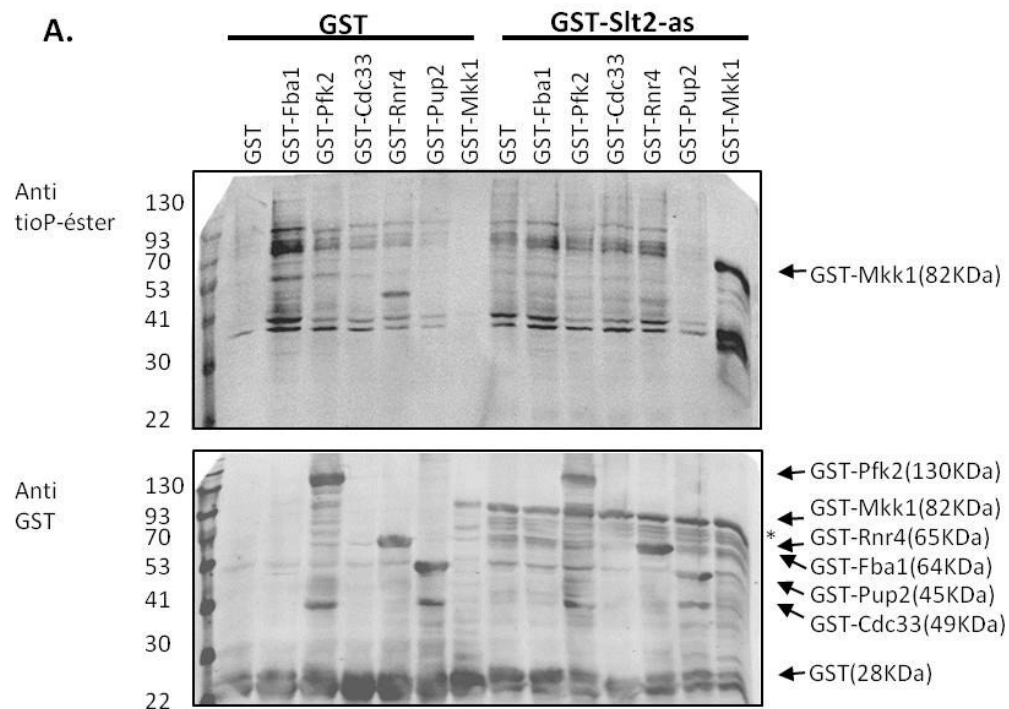


Figura 31: Ensayo quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre GST, GST-Msg5, GST-Mkk1, GST-Rcn2, GST-Caf20, GST-Gga1 y GST-Sod1, producidas en levadura. Análisis mediante *Western blotting* realizado con GST o GST-Slt2-as purificado por afinidad con una matriz de Glutathione Sepharose) a partir de los extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con pEG(KG) o PEG(KG)-*slt2-as* y tratada durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo en YPG. como sustrato se utilizan extractos procedentes de la cepa silvestre BY4741 de *S. cerevisiae* en los cuales se encuentran sobreexpresadas en fusión a GST las proteínas indicadas en la figura (colección *Open Biosystems*). Para detectar los sustratos tiofosforilados se utilizó el anticuerpo anti-tiofosfato éster y el anticuerpo anti-GST como control. Los números que aparecen debajo del panel indican los niveles de tiofosforilación de GST-Msg5 y GST-Rcn2, GST-Caf20 y GST-Gga1 con respecto a la tiofosforilación observada en ausencia de Slt2-as (valor 1). El asterisco marca la banda correspondiente a GST-Slt2-as.

En la Figura 31 se muestran las tres proteínas que son tiofosforiladas específicamente por Slt2-as de las 15 proteínas ensayadas; en concreto: Caf20, un represor traduccional de tipo 4E-BP (4E-binding protein) (Altmann *et al.*, 1997); Rcn2, un regulador de calcineurina (Mehta *et al.*, 2009) y Gga1, una proteína adaptadora asociada al aparato de Golgi e implicada en la endocitosis (Miller *et al.*, 2003). En esta Figura se puede comparar la fosforilación de estas proteínas con los controles positivos: GST-Msg5 y GST-Mkk1 (Molina *et al.*, 2010). En el ensayo representativo que se muestra en la Figura 31, también incluimos Sod1 como proteína que no muestra tiofosforilación por parte de Slt2. El resto de candidatos probados, que también dieron resultado negativo, aparecen en la Figura 32. La fusión a GST de las proteínas Fba1, Cdc33, Bbc1 y Sec31 de la colección de *Open Biosystems* no es correcta ya que en la inmunodetección con anticuerpos anti-GST se detecta la banda correspondiente a GST pero ninguna banda correspondiente a la proteína de fusión.



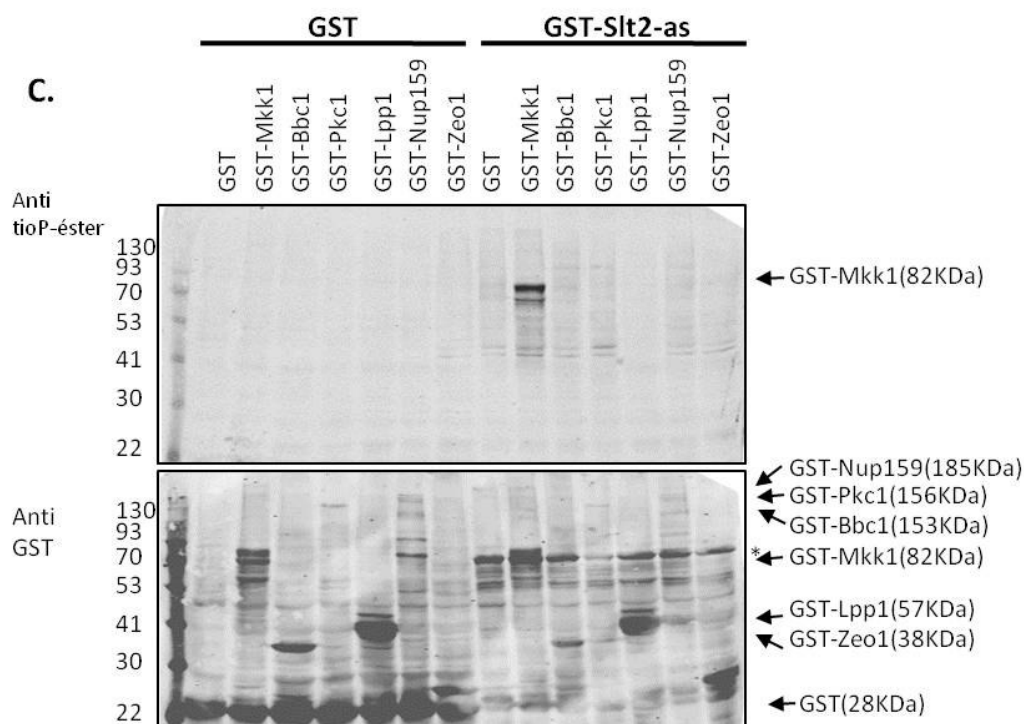


Figura 32: Ensayos quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre GST y diferentes proteínas de fusión a GST producidas en levadura. Análisis mediante *Western blotting* realizado con GST o GST-Slt2-as purificado por afinidad con una matriz de Glutation (*Glutathione Sepharose*) a partir de los extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con pEG(KG) o PEG(KG)-*slt2-as* y tratada durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo en YPG. como sustrato se utilizan extractos procedentes de la cepa silvestre BY4741 de *S. cerevisiae* en los cuales se encuentran sobreexpresadas en fusión a GST las proteínas indicadas en la figura (colección *Open Biosystems*). Para detectar los sustratos tiofosforilados se utilizó el anticuerpo anti-tiofosfato éster y el anticuerpo anti-GST como control. El asterisco marca la banda correspondiente a GST-Slt2-as. En B, GST-Pil1 en el ensayo con GST (carril 7) y GST-Lsp1 en el ensayo con GST-Slt2-as (carril 14) están intercambiados.

En paralelo y con la colaboración del Dr. Pablo Fernández Piñar se expresaron en *E. coli* algunas de estas proteínas recombinantes también en fusión a GST: Pil1, Sod1, Gga1, Pup2, Rcn2, Pfk2, Pst2, Caf20, Lpp1 y Rnr4. La Figura 33 muestra cómo las proteínas Rcn2, Caf20 y Gga1, pero no Sod1, son también tiofosforiladas por Slt2-as cuando se utilizan extractos de *E. coli* como sustrato en el ensayo quinasa *in vitro*. En esta Figura además se observa tiofosforilación en ausencia de Slt2-as de una proteína correspondiente probablemente a un producto de degradación de Rcn2. Esto puede ser debido a la actividad de una quinasa de *E. coli*. Además se incluyeron en estos ensayos la proteína Cdc33 implicada en la traducción del mRNA; Fba1, una enzima del ciclo de la glucólisis y el regulador transcripcional Tup1, que no estaban disponibles en la colección de sobreexpresión en *S. cerevisiae*, y que habían sido también identificadas como candidatas en el ensayo fosfoproteómico previo. Ninguna de las proteínas

ensayadas, a excepción de las tres mencionadas arriba, presentó marcaje específico en estos ensayos (datos no mostrados).

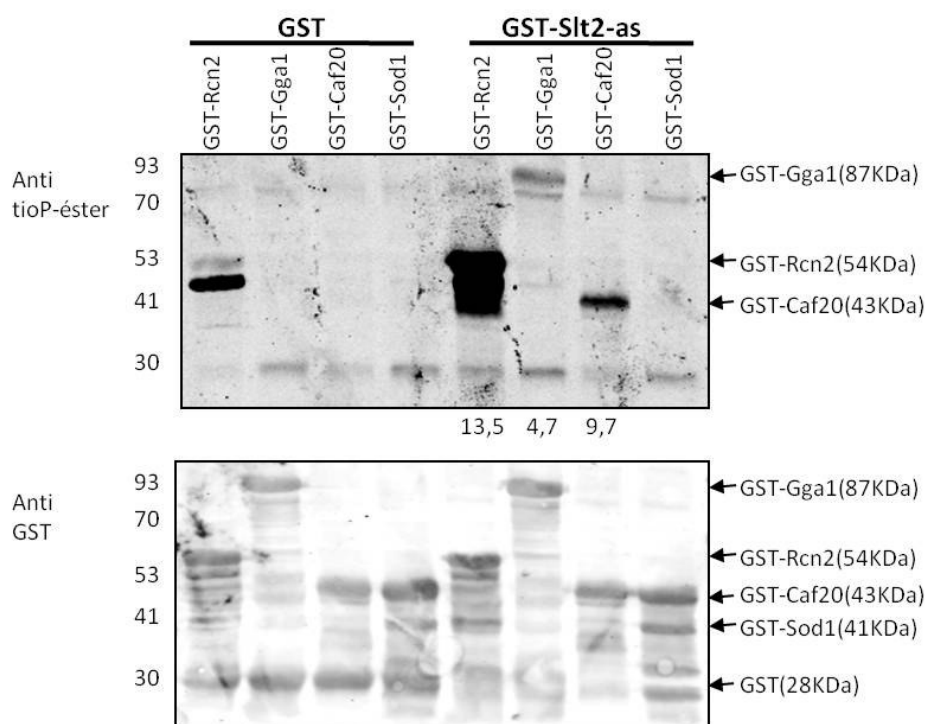


Figura 33: Ensayos quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre GST, GST-Rcn2, GST-Gga1, GST-Caf20 y GST-Sod1 expresados en *E. coli*. Western blotting de un ensayo quinasa realizado con GST o GST-Slt2-as purificados a partir de los extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con pEG(KG) o PEG(KG)-*slt2-as* y tratada durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo en YPG, sobre los sustratos indicados en la figura y expresados en *E. coli*. Para detectar los sustratos tiofosforilados se utilizó el anticuerpo anti-tiofosfato éster y el anticuerpo anti-GST como control. Los números que aparecen debajo del panel indican los niveles de tiofosforilación de GST-Rcn2 y GST-Gga1 y GST-Caf20, con respecto a la tiofosforilación observada en ausencia de Slt2-as (valor 1).

1.4.3.1. La eliminación de los posibles sitios de fosforilación por MAPKs en Rcn2 y Caf20 impide su tiofosforilación por Slt2-as

A continuación analizamos las secuencias aminoacídicas de las 3 proteínas identificadas como sustratos de Slt2 para buscar los posible sitios de fosforilación por MAPKs y encontramos 1 residuo en Caf20 correspondiente a la Thr102 (Figura 34), 4 en Rcn2 que comprenden a la Thr49, Ser152, Ser160 y Ser255 (Figura 35) y 7 en Gga1 que son Thr56, Thr183, Thr348, Ser353, Ser375, Ser378 y Ser490 (Figura 36). Debido a que Caf20 y Rcn2 presentaban menos residuos S/TP, decidimos mutar estos aminoácidos a alanina y realizar ensayos quinasa *in vitro* expresando en *E. coli* estos sustratos mutados.

MIKYTIDELFQLKPSLTLEVNFDAVEFRAIIEKVKQLQHLKEEFNSHHVGHFGRRRSSHHHG
RPKIKHNKPKVTTSDSGWCTFEAKKKGSGEDDEEETETTPSTSTVPVATIAQETLKVKNKN
ISSNRPADTRDIVADKPILGFNAFAALESEDEDEA

Figura 34: Secuencia aminoacídica de Caf20. El motivo de fosforilación S/TP aparece marcado en amarillo.

MANQKQMRTQILITDIPSGKFTSKWPTQLEKTLFKEQFPNLQSHLQYYTPLPFLNRIIIIFDNE
DDTLQVFKFLQELLAKENSGPMKLFVTESLLNNQHPRSRSTDDAVSLQDNNLALLEDHRNK
PLLSINTDPGVTGVDSSSLNKGSSLSPTDKSSLESPMTMLKSTDSKPFYQEPLKLSRSSSTS
NLSLNRSSQTSPLSQLENKDKSASGKCLFASKPLGLTIDTSTRSNAASCTENDVNATASNPP
KSPSITVNEFFH

Figura 35: Secuencia aminoacídica de Rcn2. Los motivos de fosforilación S/TP aparece marcado en amarillo.

MPQRIELTSEPVRKPRSTESSLLRKIQACRSTLPEPDLGLNLDVADYINSKQGA TP REAVLAI
EKLVNNGDTQAAVFALSLLDVLVKNGGYSIHLQISRKEFLNDLVKRFPEQPPLRYSKVQQMIL
EAIEEWYQTICKHASYKDDLQYINDMHKLLKYGYTFPKVGSENLAVLRPNQDQLR TP SELQE
EQERAQAAKLEELLRSKGPDDLKEANKLMKIMAGFKDDTKVAVKQAINNELNKLKRKADLF
NEMLSADEPDLENEAIQELYGDLKSAQPKFKLIEERDDDALVSNLSKFNDLVIQLLKRYKS
IKGMKEEELNVPDTNEPAKELNLIDFDDDTAN TP SVT SP SKSLQPFDDLGLDFNKVSL SP
SP
SQRHILNQSDHLRIDYELTRESMTKRLRVIFYSNISSDPITNFALLVA SP KGTTLSLPQSGNM
LQNSRDGIKQIASVEGISVNLGKPIKWKANYCTKGDSKEESGTTSLPTI

Figura 36: Secuencia aminoacídica de Gga1. Los motivos de fosforilación S/TP aparece marcado en amarillo.

Como se muestra en la Figura 37, a diferencia de GST-Caf20 silvestre, GST-Caf20^{T102A} no es tiofosforilada por Slt2-as, lo que indica que la Thr102 es el sitio de fosforilación por la MAPK de la ruta CWI.

En el caso de Rcn2, se obtuvieron versiones mutantes en cada uno de los sitios S/TP de manera individual (Rcn2^{T49A}, Rcn2^{S152A}, Rcn2^{S160A} y Rcn2^{S255A}) y también la versión triple mutante en las 3 serinas (Rcn2^{3SA}: Rcn2^{S152, 160 y 255A}). Como se observa en la Figura 38, mientras que la eliminación de la Thr49 no afecta la tiofosforilación de Rcn2 por Slt2-as, la eliminación de cada una de las serinas individualmente provoca una cierta disminución, que es más evidente en el caso de la Ser255. Solo cuando están mutadas las 3 serinas conjuntamente desaparece por completo la tiofosforilación que sufre Rcn2 por Slt2-as. De esta manera se confirma también que Rcn2 es sustrato de Slt2 y presenta 3 residuos de fosforilación por esta MAPK.

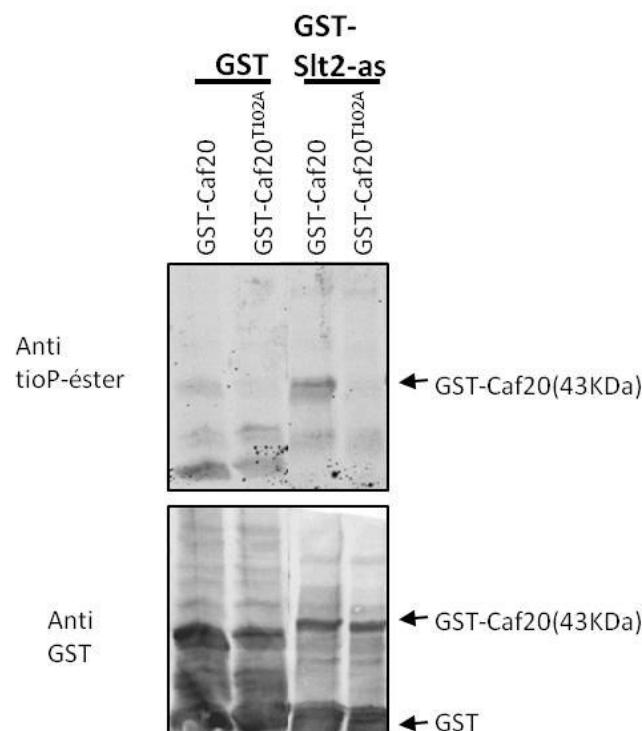


Figura 37: Ensayos quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre GST, GST-Caf20 y GST-Caf20^{T102A} expresados en *E. coli*. Western blotting de un ensayo quinasa realizado con GST o GST-Slt2-as purificados a partir de los extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con pEG(KG) o PEG(KG)-*slt2-as* y tratada durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo en YPG, sobre los sustratos indicados en la figura y expresados en *E. coli*. Para detectar los sustratos tiofosforilados se utilizó el anticuerpo anti-tiofosfato éster y el anticuerpo anti-GST como control.

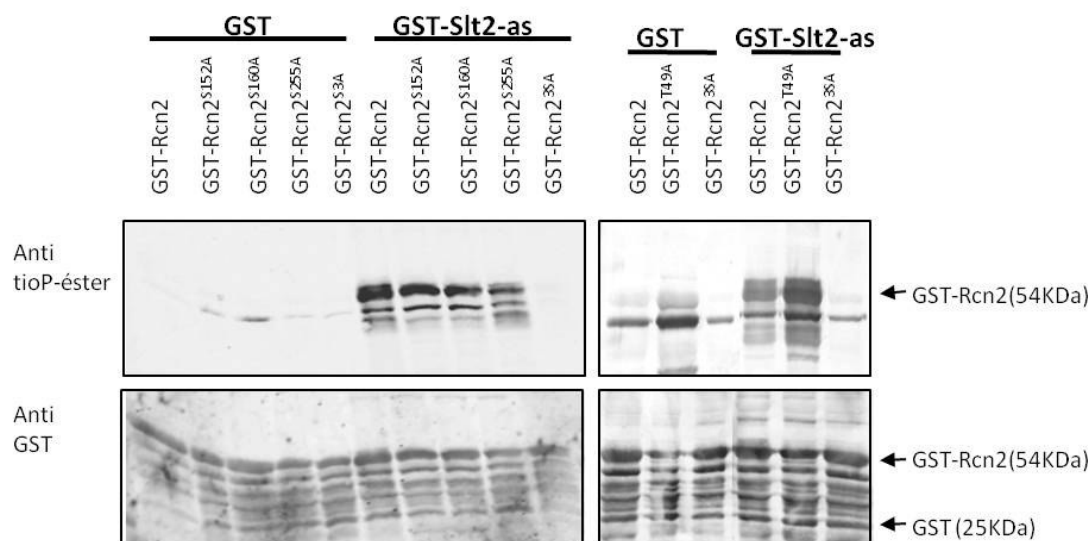


Figura 38: Ensayos quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre GST, GST-Rcn2 y GST-Rcn2^{S152A}, GST-Rcn2^{S160A}, GST-Rcn2^{S255A}, GST-Rcn2^{S35A} y GST-Rcn2^{T49A} expresados en *E. coli*. Western blotting de un ensayo quinasa realizado con GST o GST-Slt2-as purificados a partir de los extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con pEG(KG) o PEG(KG)-*slt2-as* y tratada durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo en YPG. Como sustratos utilizamos tanto Rcn2 silvestre como aquellas versiones que presentan mutados los distintos sitios posibles de fosforilación de MAPK de manera individual o simultáneamente (GST-Rcn2^{S35A}, S152A, S255A y S260A). Todas estas versiones de Rcn2 fueron expresadas en *E. coli*. Para detectar los sustratos tiofosforilados se utilizó el anticuerpo anti-tiofosfato éster y el anticuerpo anti-GST como control.

1.4.3.2. *Rcn2*, *Caf20* y *Gga1* interaccionan con *Slt2*

Por último, quisimos determinar si la fosforilación de *Rcn2*, *Caf20* y *Gga1* por parte de *Slt2* se debía a una interacción directa entre estas proteínas. Para ello se llevó a cabo un ensayo de co-purificación utilizando extractos proteicos de una cepa que expresaba *Slt2* marcado con 6 copias del epítipo myc, transformada con los plásmidos de la colección de sobreexpresión *Open Biosystems* que presentaban estos sustratos fusionados a GST.

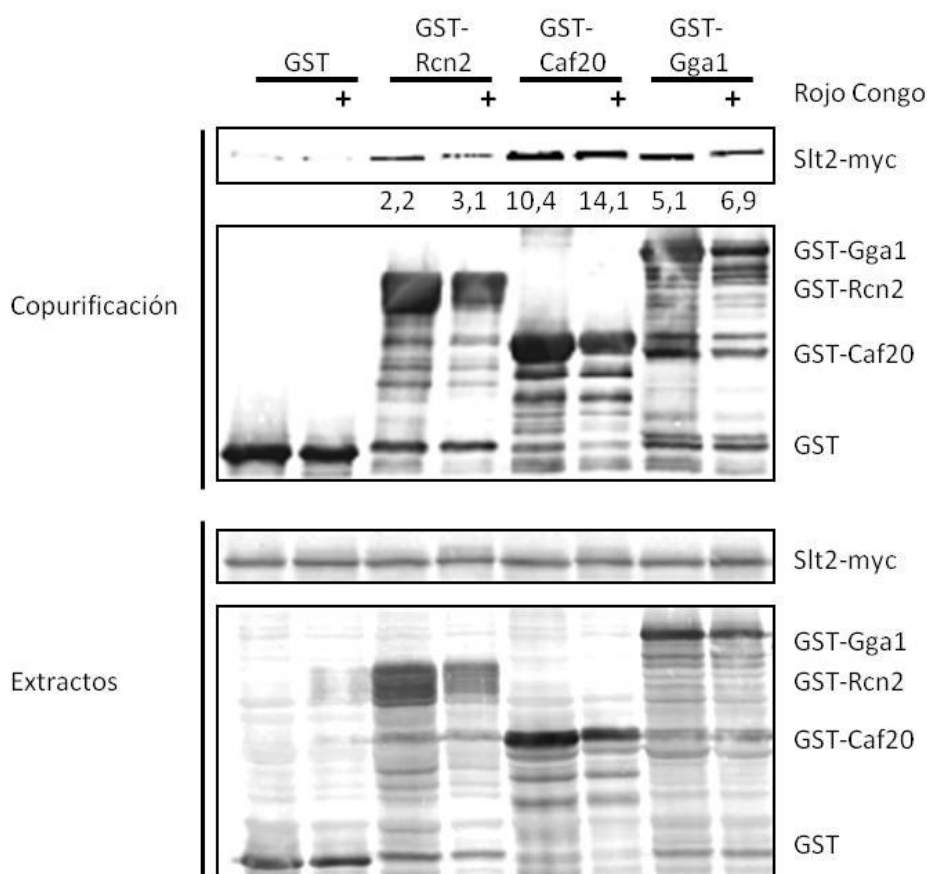


Figura 39: Ensayo de copurificación de *Slt2*-myc con las proteínas *Rcn2*, *Caf20* y *Gga1* fusionadas a GST. Análisis mediante *Western blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de co-purificación *in vitro* de la cepa YMF3 (*SLT2::6MYC*) transformada de manera individual con los plásmidos de la colección de sobreexpresión de *Open Biosystems* donde se expresan las proteínas *Rcn2*, *Caf20* y *Gga1* bajo el control del promotor *GAL1* y fusionadas a GST. Los extractos proteicos se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) y se utilizaron los anticuerpos anti-myc para detectar *Slt2* y anti-GST para las distintas proteínas fusionadas a GST. Los números que aparecen debajo del panel indican el ratio de interacción con *Slt2*-myc de GST-*Rcn2* y GST-*Caf20* y GST-*Gga1*, en ausencia y presencia de 30µg/lm de rojo Congo con relación a la interacción mostrada por GST en cada una de estas condiciones (valor 1).

Estos experimentos se realizaron tanto en condiciones basales como en condiciones de activación de la ruta de integridad celular con rojo Congo. Como se muestra en la Figura 39, las tres proteínas retienen a *Slt2*-myc de manera más intensa que GST, tanto en ausencia como en presencia del estímulo. Los resultados muestran, por tanto, que tanto *Rcn2* como *Caf20* y *Gga1*

interaccionan físicamente con Slt2 y que esta interacción es independiente de la activación de la ruta CWI. Los números indican el grado de retención de Slt2-myc por GST-Rcn2, GST-Caf20 y GST-Gga1 en relación a la retención por GST.

1.4.3.3. La delección de *GGA2*, parálogo de *GGA1*, en el mutante *slt2Δ* incrementa la sensibilidad a estrés sobre la pared celular.

Para determinar si estos sustratos de Slt2 participan en la respuesta de la ruta CWI, estudiamos la sensibilidad a estrés sobre la pared celular de los mutantes delecionados en los

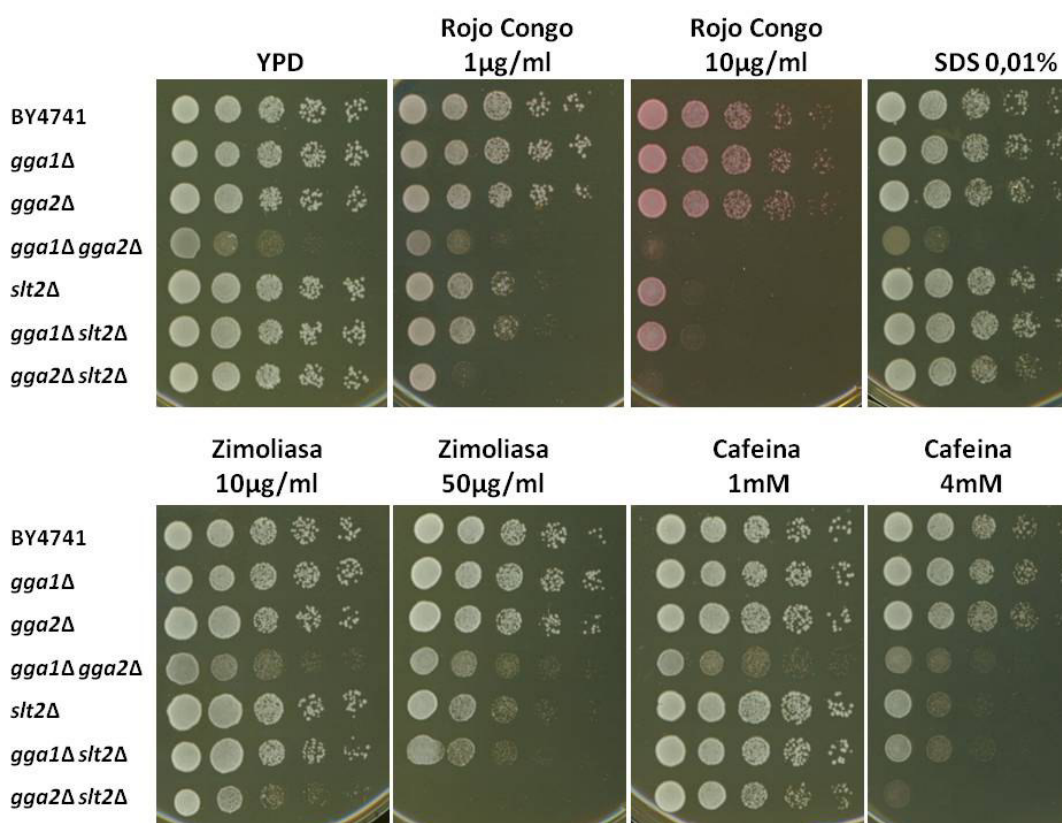


Figura 40: Sensibilidad de los mutantes *gga1Δ*, *gga2Δ*, *gga1Δ gga2Δ*, *slt2Δ*, *gga1Δ slt2Δ* y *gga2Δ slt2Δ* a estreses de pared. Ensayo de crecimiento en gotas mediante diluciones decimales seriadas de la cepa silvestre BY4741 y los mutantes *gga1Δ* (YES7), *gga2Δ* (YES8), *gga1Δ gga2Δ* (YES9), *slt2Δ* (YSTH32), *gga1Δ slt2Δ* (YES10) y *gga2Δ slt2Δ* (YES11) en placas de YPD suplementadas con rojo Congo (1 y 10 µg/ml), SDS (0,01%), zimoliasa (10 y 50 µg/ml) o cafeína (1 y 4 mM). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas.

genes correspondientes, tanto simples como en combinación con *slt2Δ*. Además, dado que tanto Rcn2 como Gga1 tienen parálogos, denominados Rcn1 y Gga2 respectivamente (Miller *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2009), se generaron también los dobles mutantes *gga1Δ gga2Δ*, *gga2Δ slt2Δ*, *rcn1Δ rcn2Δ* y *rcn1Δ slt2Δ*. Observamos cómo la delección individual de estos genes no afecta la sensibilidad a rojo Congo, zimoliasa, SDS o cafeína a concentraciones que inhiben el crecimiento de un mutante *slt2Δ*, ni la delección de *GGA1*, *RCN1*, *RCN2* y *CAF20* en el mutante *slt2Δ* agrava el

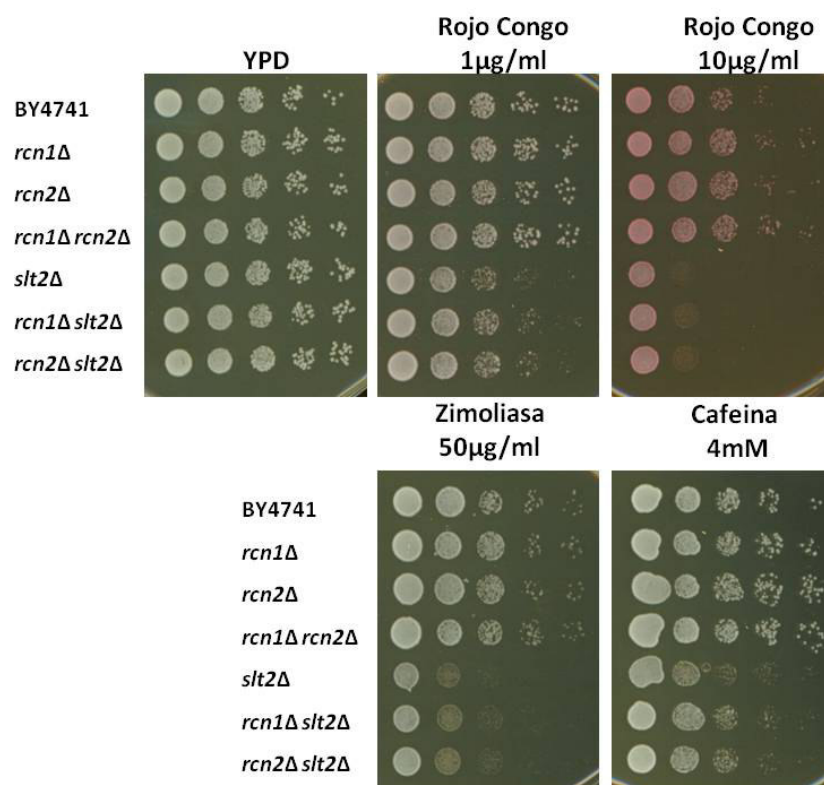


Figura 41: Sensibilidad de los mutantes *rcn1Δ*, *rcn2Δ*, *rcn1Δ rcn2Δ*, *slt2Δ*, *rcn1Δ slt2Δ* y *rcn2Δ slt2Δ* a estreses de pared. Ensayo de crecimiento en gotas mediante diluciones decimales seriadas de la cepa silvestre BY4741 y los mutantes *rcn1Δ* (YES12), *rcn2Δ* (YES13), *rcn1Δ rcn2Δ*(YES14), *slt2Δ* (YSTH32), *rcn1Δ slt2Δ* (YES15) y *rcn2Δ slt2Δ* (YES16) en placas de YPD suplementadas con rojo Congo (1 y 10 µg/ml), zimoliasa (50 µg/ml) o cafeína (4 mM). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas.

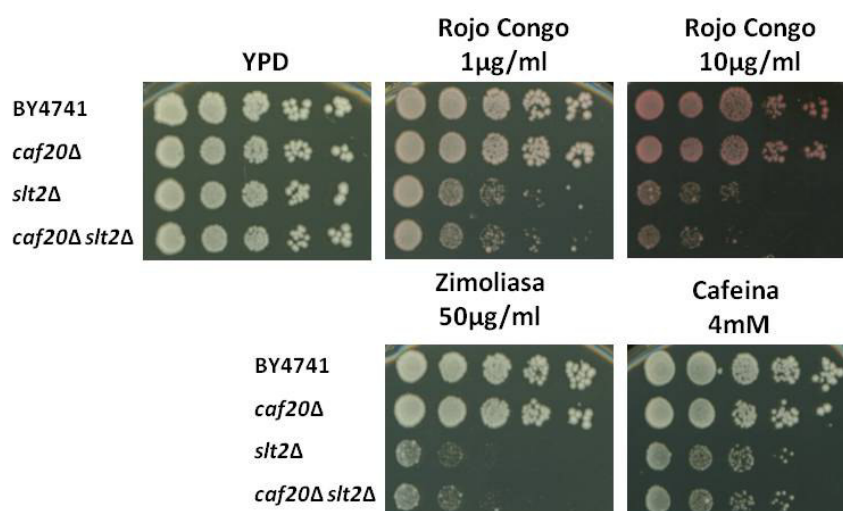


Figura 42: Sensibilidad de los mutantes *caf20Δ*, *slt2Δ* y *caf20Δ slt2Δ* a estreses de pared. Ensayo de crecimiento en gotas mediante diluciones decimales seriadas de la cepa silvestre BY4741 y los mutantes *caf20Δ* (YES17), *slt2Δ* (YSTH32) y *caf20Δ slt2Δ* (YES18) en placas de YPD suplementadas con rojo Congo (1 y 10 µg/ml), zimoliasa (50 µg/ml) o cafeína (4 mM). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas.

fenotipo de este mutante simple. Sin embargo, la eliminación de *GGA2* en el mutante *slt2Δ* provoca una inhibición del crecimiento en presencia de estos compuestos mayor que la mostrada por el mutante *slt2Δ* sencillo. Además pudimos observar cómo el doble mutante *gga1Δ gga2Δ* es muy sensible a cualquiera de estas condiciones, si bien presenta problemas de crecimiento incluso en ausencia de estrés (Figuras 40, 41 y 42).

1.4.3.4. La sobreexpresión de *RCN2*, *CAF20* y *GGA1* no complementan la sensibilidad de *slt2Δ* a compuestos que activan la ruta CWI

Además analizamos si la sobreexpresión de *RCN1*, *RCN2*, *CAF20*, *GGA1* o *GGA2* era capaz de complementar el fenotipo de un mutante *slt2Δ* y observamos cómo en ninguno de los casos se redujo la sensibilidad del mutante carente de la MAPK a rojo Congo, zimoliasa o cafeína (Figura 43).

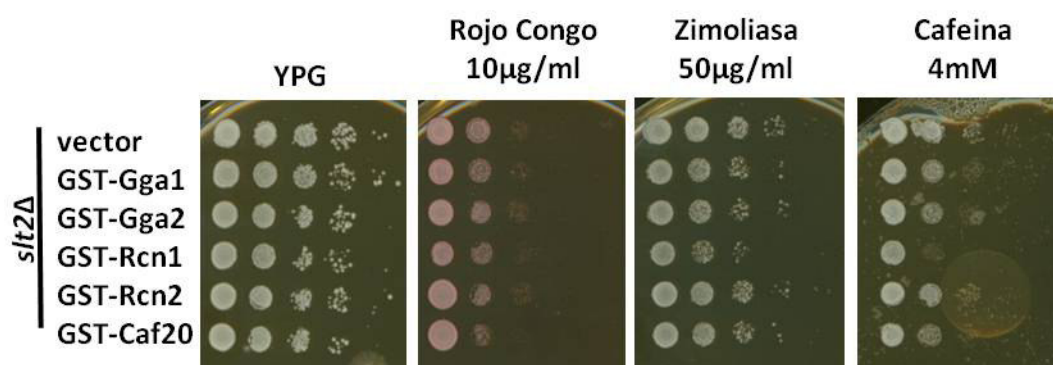


Figura 43: Efecto de la sobreexpresión de Gga1, Gga2, Rcn1, Rcn2 y Caf20 sobre la sensibilidad de *slt2Δ* a rojo Congo, zimoliasa y cafeína. Ensayo de crecimiento en gotas mediante diluciones decimales seriadas de la cepa mutante Y00993 (*slt2Δ*) transformada con el vector vacío pEGH-GST o los vectores que expresan las proteínas Gga1, Gga2, Rcn1, Rcn2 y Caf20 fusionadas a GST y bajo el control del promotor inducible por galactosa (*Open Biosystems*). Las células fueron cultivadas en placas de YPG suplementadas con 10μg/ml de rojo Congo, 50μg/ml de zimoliasa o 4mM de cafeína e incubadas a 30°C durante 48 horas.

1.4.3.5. *Slr2-as tiofosforila Rcn1*

Rcn2, junto con su parálogo Rcn1, regula la respuesta a Ca^{2+} tanto en hongos como en células animales actuando sobre la ruta de la calcineurina. Sobre Rcn2 hay muy pocos datos en la bibliografía, pero se sabe que Rcn1 tiene 2 sitios susceptibles de fosforilación por MAPKs: la serina 113 y la serina 117. Estos residuos se encuentran dentro del motivo de fosforilación FLISPPxSPP, el cual está conservado en eucariotas superiores y es susceptible de fosforilación por Gsk3 (Woodgett, 2001; Hilioti *et al.*, 2004). Estos autores describieron un mecanismo

mediante el cual, para que Rcn1 active la ruta de la calcineurina es necesario que Mck1, una quinasa de especificidad dual perteneciente a la familia Gsk3, la fosforile en la Ser113. Para ello realizaron un ensayo quinasa *in vitro* utilizando GST-Rcn1 y GST-Rcn1^{S113A} expresadas en *E. coli*, γ -³²P[ATP] y Mck1 purificada de levadura. Mediante este ensayo además observaron que para que la fosforilación de la serina 113 de Rcn1 por parte de Mck1 ocurra, es necesaria una fosforilación previa de Rcn1 por parte de una MAPK como p42 de mamífero. Para determinar si Slt2 actúa sobre Rcn1 regulando de este modo la respuesta a Ca²⁺, expresamos en *E. coli* esta proteína fusionada a GST y en un ensayo quinasa *in vitro* observamos cómo en presencia de Slt2-as esta proteína resulta selectivamente tiofosforilada (Figura 44). Además mutamos los dos residuos S-P (Ser113 y Ser117) a alanina para identificar sobre cuál de ellos estaba actuando Slt2. Sin embargo, tanto en los mutantes individuales como incluso eliminando estos dos residuos conjuntamente, seguimos observando tiofosforilación por Slt2-as en Rcn1.

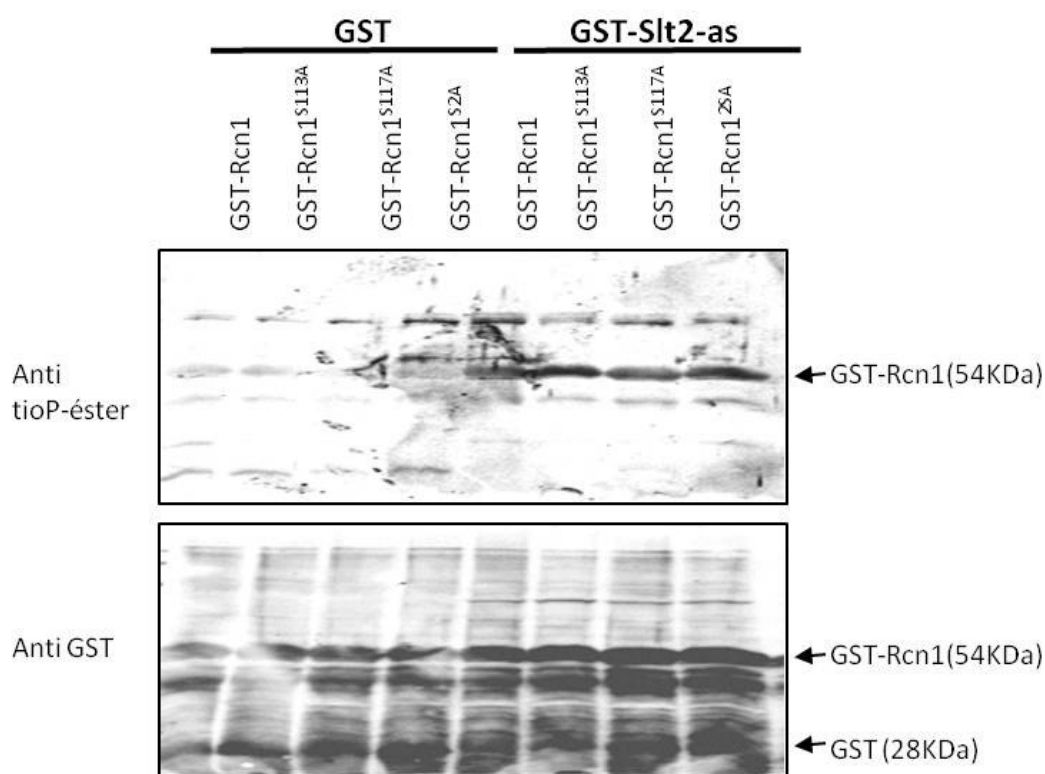


Figura 44: Ensayos quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre GST, GST-Rcn1 y GST-Rcn1^{S113A}, GST-Rcn1^{S117A} y GST-Rcn1^{S2A} expresados en *E. coli*. Western blotting de un ensayo quinasa realizado con GST o GST-Slt2-as purificados a partir de los extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con pEG(KG) o PEG(KG)-*slt2-as* y tratada durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo en YPG. Como sustratos utilizamos tanto Rcn1 silvestre como las versiones que presentan mutados los distintos sitios posibles de fosforilación de MAPK de manera individual o simultáneamente (GST-Rcn1^{S2A}, S111A y S117A). Todas estas versiones de Rcn1 fueron expresadas en *E. coli*. Para detectar los sustratos tiofosforilados se utilizó el anticuerpo anti-tiofosfato éster y el anticuerpo anti-GST como control.

1.4.3.6. *Slt2* participa en el tráfico de proteínas a través de la vía CPY

Las proteínas GGAs (*Golgi-associated, gamma adaptin ear-containing, ARF binding protein*) actúan como proteínas adaptadoras de clatrina y regulan el tráfico de cargos a través

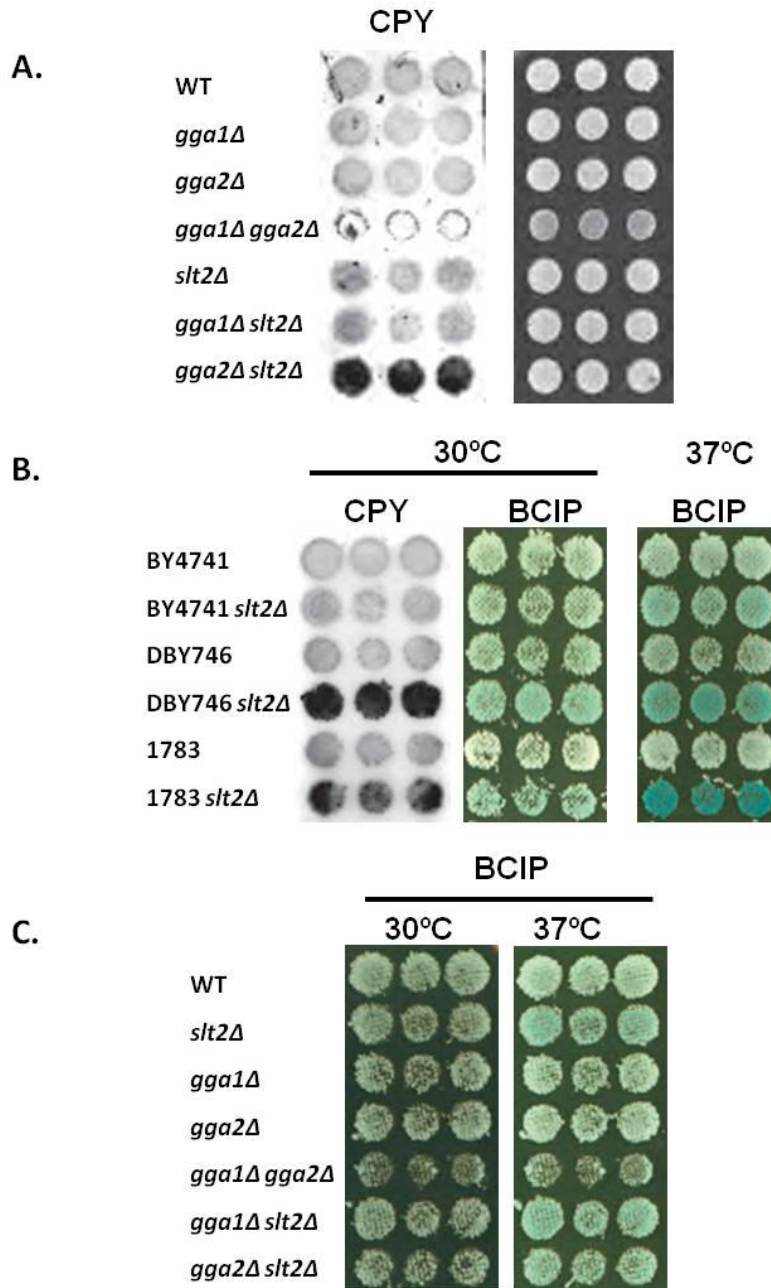


Figura 45: Ensayos carboxipeptidasa (CPY) y lisis celular (BCIP) en los mutantes *gga1Δ*, *gga2Δ* y *slt2Δ*. **A.** Parches de la cepa silvestre BY4741 y los mutantes *gga1Δ*(YES7), *gga2Δ*(YES8), *gga1Δ gga2Δ*(YES9), *slt2Δ*(YSTH32), *gga1Δ slt2Δ*(YES10) y *gga2Δ slt2Δ*(YES11) crecidas en medio YPD durante 48 horas a 30°C (panel derecho) y replicadas en una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectadas con anti-CPY (panel izquierdo). **B.** El panel de la izquierda es un ensayo de CPY similar al del apartado A utilizando las cepas silvestres BY4741, DBY746 y 1783 y los mutantes *slt2Δ* en cada uno de estos fondos (Y00993, DBY746DK y DL454) y los otros dos paneles indican la liberación de fosfatasa alcalina (AP) en placas suplementadas con 5-bromo-4-clor-3-indol fosfato (BCIP) e incubadas a 30 y 37°C durante 24 horas. **C.** Experimento similar al del apartado B de liberación de AP utilizando las cepas del apartado A.

del Golgi (Miller *et al.*, 2003). Debido a que en levadura la pérdida de estas dos proteínas provoca un fallo en el transporte de la proteína carboxipeptidasa Y (CPY) a la vacuola y la salida de la CPY al espacio periplásmico (Dell'Angelica *et al.*, 2000), analizamos el papel de Slt2 en esta vía. Para ello estudiamos la secreción de CPY en los mutantes simples *gga1Δ*, *gga2Δ* y *slt2Δ* y en los dobles mutantes resultado de la combinación de la delección de estos genes. Como se muestra en la Figura 45A, a diferencia de lo que ocurre en los mutantes simples *gga2Δ* y *slt2Δ* o en el mutante doble *gga1Δ slt2Δ* que se comportan como la cepa silvestre, en el mutante *gga2Δ slt2Δ* se produce un incremento en la secreción de CPY. Para descartar que el incremento en la secreción extracelular de CPY en estos mutantes fuese debido a lisis celular, analizamos en paralelo la salida al medio de la fosfatasa alcalina (AP) intracelular, utilizando un sustrato cromogénico de esta fosfatasa, el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP). En la Figura 45B se muestra que en mutantes que presentan una elevada liberación de AP al medio, como el mutante *slt2Δ* en los fondos genéticos DBY746 o 1783, se observa también una elevada secreción de CPY. Sin embargo, esto no ocurre en el mutante *slt2Δ* en el fondo BY4741, que presenta menos lisis celular tanto a 30°C como a 37°C, con una liberación de AP y de CPY al medio similar a la de la cepa isogénica silvestre. En la Figura 45C se muestra cómo en el mutante *gga2Δ slt2Δ* obtenido en el fondo BY4741, tampoco se observa una mayor liberación de AP en comparación con la cepa isogénica silvestre, lo que indica que la secreción incrementada de CPY en este doble mutante (Figura 45A) no es debida a un proceso de lisis celular.

2. CARACTERIZACIÓN DE UN CIRCUITO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL DE LA RUTA CWI DE *S. cerevisiae* Y SU APLICACIÓN EN LA BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS QUE ACTIVAN LA RUTA Y DE COMPONENTES REGULADORES

2.1. Construcción de plásmidos portadores del Circuito de Amplificación de la señal de la ruta de Integridad Celular (IPAC)

El circuito IPAC está compuesto por el alelo hiperactivo de una de las MAPKK de la ruta CWI, *Mkk1*^{S386P} (Watanabe *et al.*, 1995), bajo el control del promotor de *MLP1*, uno de los genes que más se induce en condiciones de activación de la ruta (Arias *et al.*, 2011), y seguido de la secuencia de terminación de la transcripción del gen *ADH1* (Figura 46). Este circuito, expresado en el plásmido pCWIST, está integrado en el *locus* HO de la levadura y presenta sitios de restricción para *PspOM1* y *BamH1* por delante de *MLP1* y por detrás de la secuencia de terminación, respectivamente. Para disponer de herramientas que nos permitiesen combinar el circuito IPAC con distintas mutaciones y trabajar así de manera más versátil, decidimos expresarlo en plásmidos centroméricos y episómicos. Para esto fue necesario introducir primero

en el plásmido centromérico YCplac111 el punto de corte *PspOM1* por detrás de *EcoR1*, y *BamH1* por delante de *HindIII*. Para ello realizamos una amplificación por PCR de un fragmento del gen de *steC* de *Salmonella* que contenía la secuencia correspondiente a estos puntos de corte, utilizando los oligonucleótidos *EcoR1-PspOM1* y *BamH1-HindIII* e introdujimos este fragmento en el plásmido YCplac111 entre los puntos de corte *EcoR1* y *HindIII*. Posteriormente, utilizando los sitios de restricción *PspOM1* y *BamH1* clonamos el IPAC en este vector. Para tener el IPAC en pHR70, otro plásmido centromérico y en el plásmido episómico YEplac181, clonamos el IPAC desde el plásmido YCplac111 utilizando los puntos de corte *EcoR1* y *BamH1*. No obtuvimos transformantes utilizando el IPAC expresado en el plásmido episómico, posiblemente debido a que el estrés producido en el proceso de transformación activa el IPAC impidiendo la aparición de colonias que expresaran esta construcción.

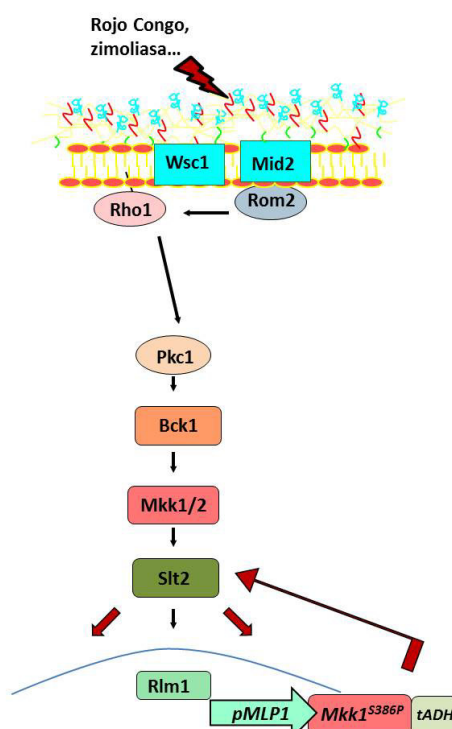


Figura 46: Esquema del circuito génico de amplificación de la señal de la ruta CWI (IPAC).

2.2. La estimulación de la ruta CWI conduce a la inhibición del crecimiento en cepas portadoras del IPAC

Como primera aproximación para estudiar el fenotipo de cepas que portan el IPAC, tanto integrado en el genoma como en los plásmidos centroméricos, frente a compuestos que dañan la pared celular, se realizaron siembras en gotas a partir de diluciones decimales seriadas en presencia de bajas concentraciones de rojo Congo. En todos los casos la presencia del IPAC provoca una mayor sensibilidad a este estrés de pared en relación a la de las cepas que no lo contienen con las que fueron comparadas (Figura 47).

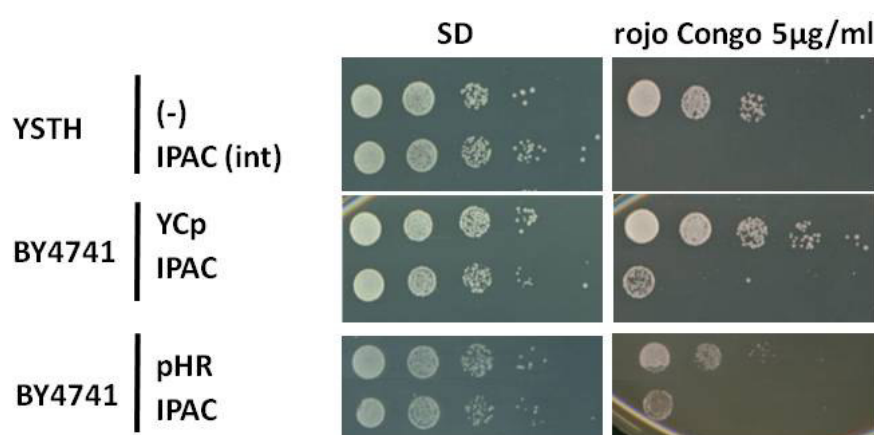


Figura 47: Estudio del efecto del rojo Congo sobre cepas que portan el circuito IPAC. Ensayo de crecimiento en gotas de diluciones decimales seriadas en medio SD de las cepas que portan el circuito integrado (YSTH2) o en un vector centromérico (BY4741+YCplac111-IPAC o BY4741+pHR70-IPAC) frente a la cepa isogénica YSTH1 o a la cepa BY4741 transformada con los plásmidos vacíos YCplac111 o pHR70, en ausencia y presencia de 5µg/ml de rojo Congo.

Además, mediante ensayos de halo de inhibición del crecimiento estudiamos la sensibilidad a rojo Congo de cepas con el IPAC integrado en el genoma o en el plásmido YCplac111, comparándola con las cepas silvestres YSTH1 o la cepa BY4741 transformada con el plásmido vacío, y con los mutantes de delección de la MAPK de la ruta en los correspondientes fondos genéticos. Como se observa en la Figura 48, las cepas que presentaban el IPAC muestran un mayor halo de inhibición del crecimiento incluso comparadas con los mutantes *s/t2Δ*. Por otro lado observamos cómo la cepa que presenta este circuito integrado en el genoma es un poco más sensible que la que lo expresa desde el plásmido centromérico.

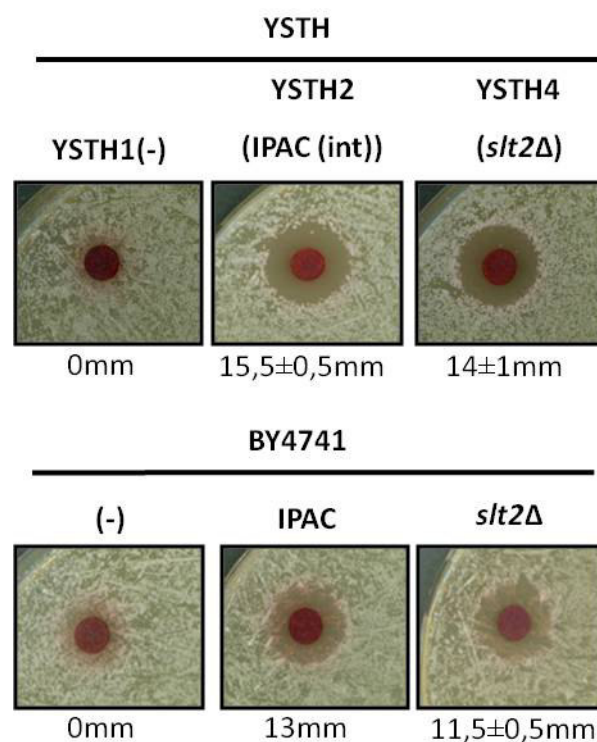


Figura 48: Estudio del efecto del rojo Congo sobre las cepas que portan el circuito IPAC. Ensayo de halo de inhibición del crecimiento en las cepas YSTH1, YSTH2 (IPAC integrado), YSTH4 (*slt2Δ*), BY4741 transformada con YCplac111 (-) o YCplac111-IPAC y el mutante de delección *slt2Δ* (Y00993) en el fondo BY4741, utilizando discos de 6mm de diámetro impregnados con 20μl de rojo Congo a una concentración de 10mg/ml. Las medidas corresponden a la media de los diámetros del halo y las desviaciones de 3 experimentos.

2.3. El IPAC promueve un incremento de la señalización a través de la ruta CWI

Utilizando tanto la versión del IPAC integrada en el genoma de la levadura, como la expresada en el plásmido centromérico YCplac111, quisimos ver si la hipersensibilidad a daño en pared se correlacionaba con una mayor activación de la ruta. Para ello estudiamos los niveles de fosforilación de la MAPK de la ruta mediante *Western blotting*.

Como se muestra en la Figura 49, la fosforilación de Slt2 tras el tratamiento con rojo Congo es mayor en la cepa que porta el IPAC en comparación con la cepa silvestre YSTH1 o la BY4741 transformada con el plásmido vacío. También observamos cómo la presencia de este circuito incrementa la activación de la ruta CWI a lo largo del tiempo.

Además, en la cepa que expresa el IPAC a partir del plásmido YCplac111, analizamos la inducción transcripcional de la ruta, determinando la actividad β-galactosidasa del gen reportero *lacZ* bajo el control del promotor de *MLP1* y comprobamos cómo la activación de esta ruta es

aproximadamente el doble en la cepa que porta el IPAC (Figura 50A). De igual modo quisimos saber si la presencia del IPAC alteraba el modo de detectar el estímulo y la regulación de la ruta

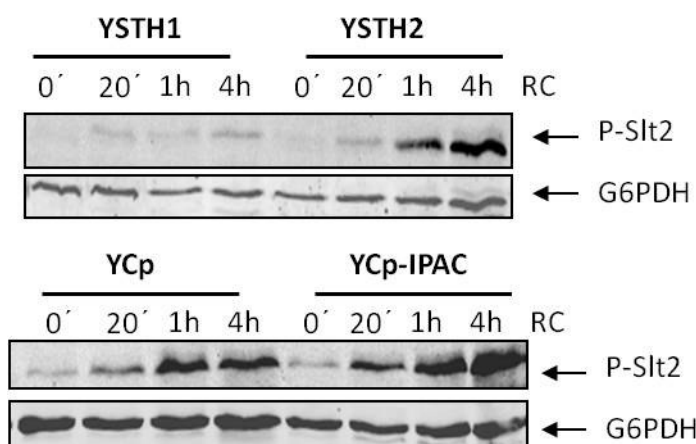


Figura 49: Efecto de IPAC sobre la fosforilación de Slt2 en respuesta a rojo Congo. Extractos procedentes de las cepas YSTH1, YSTH2 (que porta el IPAC) o BY4741 transformada con los plásmidos YCplac111 o YCplac111-IPAC tratadas con 30µg/ml de rojo Congo a los tiempos indicados y analizadas por *Western blotting* utilizando anticuerpos específicos frente a la forma doblemente fosforilada de la MAPK (anti-fosfo p44/42). La carga de proteínas se monitorizó con anti-G6PDH.

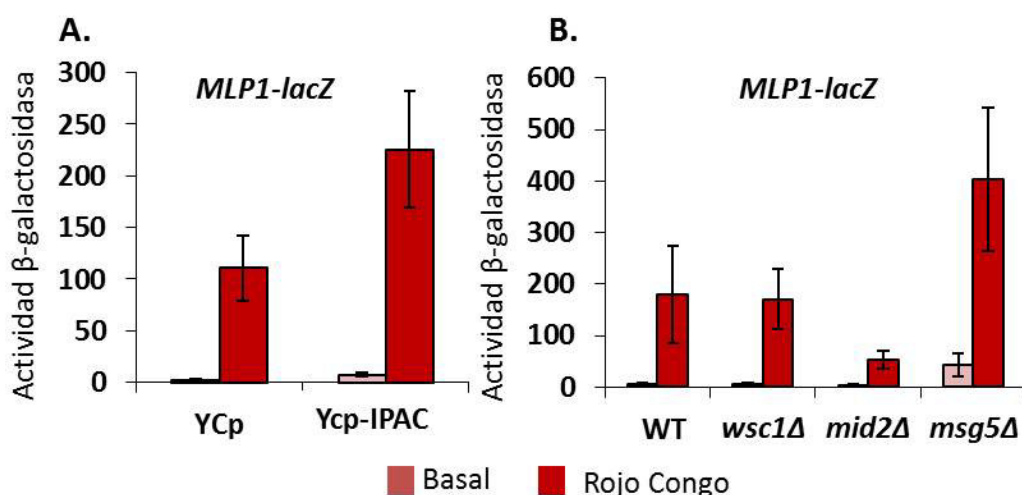


Figura 50: Estudio de la actividad transcripcional dependiente de IPAC en respuesta a rojo Congo. **A.** Con los extractos proteicos de la cepa BY4741 transformada simultáneamente con los plásmidos YCplac111 o YCplac111-IPAC y *MLP1-lacZ* (YE_p352-*pMLP1-lacZ*) y sometida al tratamiento de rojo Congo (30µg/ml) durante 4 horas, se realizaron ensayos de β-galactosidasa para determinar la activación transcripcional de *MLP1*. **B.** Ensayo de β-galactosidasa en la cepa silvestre y en los mutantes Y06672 (*wsc1Δ*), Y06672 (*mid2Δ*) e Y07373 (*msg5Δ*) transformadas con YCplac111-IPAC y *MLP1-lacZ* (YE_p352H-*pMLP1-lacZ*) en presencia de 30µg/ml de rojo Congo (4 horas). Tanto en A como en B se representaron los valores medios y la desviación estándar de tres transformantes independientes.

CWI. Para ello estudiamos la activación transcripcional en mutantes carentes de Wsc1 o Mid2, los dos sensores principales de la ruta, o de la fosfatasa Msg5. Así observamos cómo en cepas que portan el IPAC, el rojo Congo sigue siendo detectado por Mid2 (Bermejo *et al.*, 2010), ya que en un mutante carente de este sensor se reduce considerablemente la transcripción del gen reportero en presencia de este compuesto (Figura 50B), lo cual no ocurre en el mutante *wsc1Δ*. En ausencia de la fosfatasa se produce el incremento esperado en la activación transcripcional (Martín *et al.*, 2005) en la cepa que porta el IPAC, lo que indica que la ruta, en presencia del IPAC, sigue regulándose por los mismos componentes (Figura 50B).

2.4. Rastreo de posibles compuestos activadores de la ruta CWI mediante el IPAC

Una vez demostrada la funcionalidad del circuito genético para amplificar las señales de la ruta de integridad celular y basándonos en la hipersensibilidad que provoca a estímulos específicos de esta ruta, decidimos rastrear una serie de compuestos para así identificar nuevos activadores de la ruta CWI. Para ello realizamos ensayos de halo de inhibición del crecimiento

Tabla 8: Tabla de los compuestos que presentaron mayor halo de inhibición en presencia de IPAC (YSTH2) en relación a la cepa silvestre (YSTH1). En la tabla se representan las medias y las desviaciones estándar de los diámetros de los halos en presencia de cada compuesto de 3 experimentos independientes. Las medidas de los diámetros de halo están expresadas en mm.

Compuesto	Concentración	Solvente	Ø halo WT	Ø halo IPAC
rojo Congo	15mM (10mg/ml)	H ₂ O	0	15,5±0,5
SDS	0,1M (3%)	H ₂ O	8,5±0,5	21±1
Tris HCl pH 8,9		H ₂ O	9	14
Ortovanadato sódico	100mM	H ₂ O	0	9,5±0,5
EDTA	30mM	H ₂ O	13,5±0,5	20±0,5
Clotrimazol	0,3mM (100µg/ml)	etanol	14±1	18±0,5
Cloruro de cobalto	1M	H ₂ O	23±1	23,5±0,5
Cloruro de Zn	1M	H ₂ O	18,5±0,5	23±1,5
Neomicina	10M (10mg/ml)	H ₂ O	0	11±1
Difenilhidramina clorhidrato	0,1M (25mg/ml)	H ₂ O	0	11,5±1
Cloruro de litio	1M	H ₂ O	0	15,5±0,5
Caspofungina	1,7µM (20µg/ml)	DMSO	11,5±0,5	16±1

utilizando la cepa que presenta el IPAC integrado, ya que ésta mostraba mayor sensibilidad que aquellas que portaban el circuito en un plásmido centromérico. Este tipo de ensayo nos permitió, de una manera sencilla y en una misma placa, rastrear varios compuestos utilizando el

rojo Congo como control positivo. Las concentraciones utilizadas de rojo Congo y otros activadores de la ruta ya descritos, como el ortovanadato sódico, fueron inferiores a las

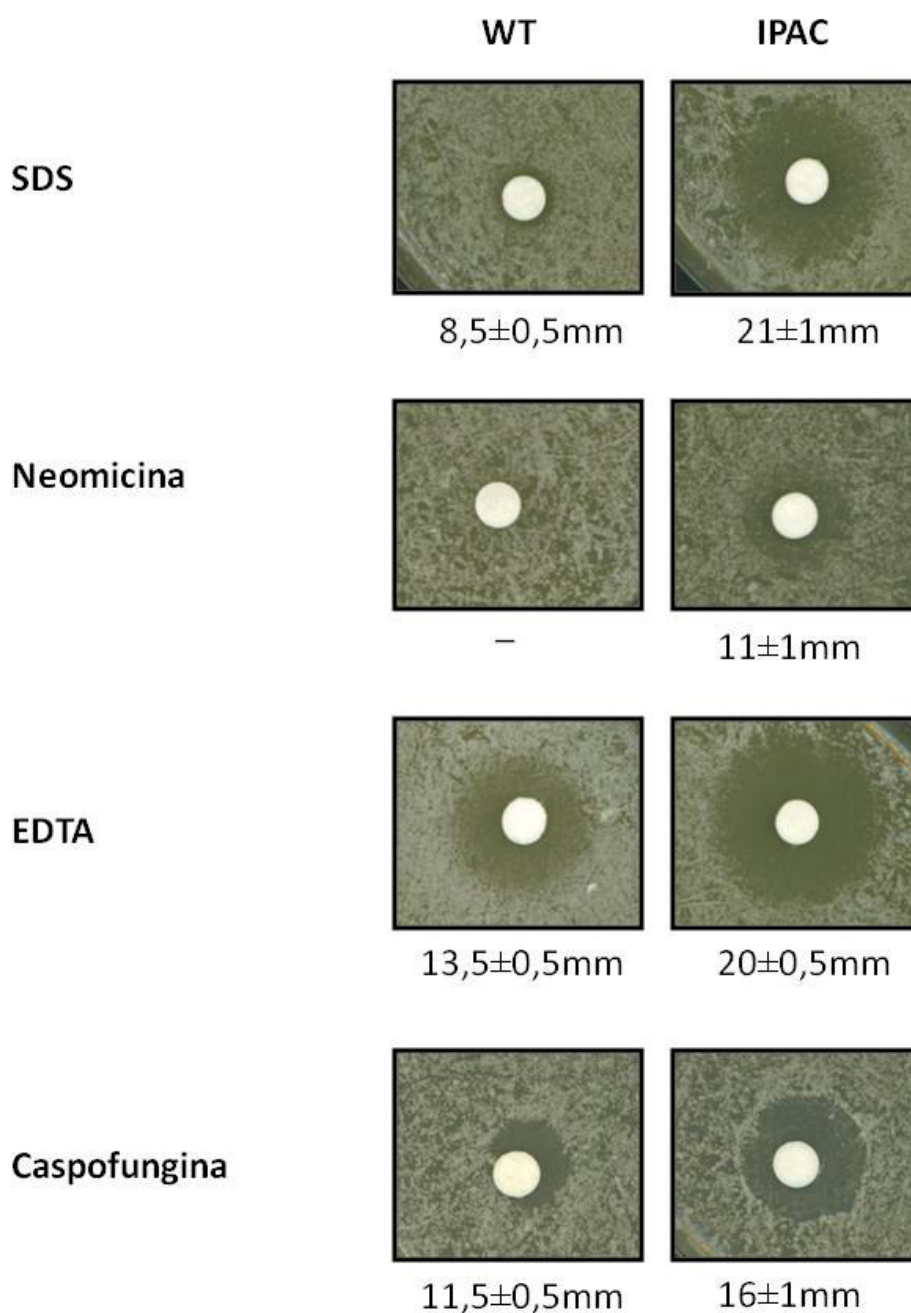


Figura 51: Comparación de la inhibición del crecimiento en una cepa silvestre frente a la cepa IPAC en presencia de distintos compuestos. Ensayo de halo de inhibición del crecimiento en la cepa que presenta el IPAC integrado en el genoma (YSTH2) y su isogénica silvestre (YSTH1) utilizando discos de 6mm de diámetro impregnados con 20µl de SDS al 3%, 10mg/ml de neomicina, EDTA 3mM y 20µg/ml de caspofungina.

empleadas para inducir sensibilidad en una cepa silvestre. Se probaron 99 compuestos (Tabla 5 en la sección de Materiales y Métodos) y en la Tabla 8 están recogidos aquellos compuestos que mostraron mayor capacidad de inhibición de crecimiento en la cepa que porta el IPAC con

respecto a la cepa que no lo lleva, así como las concentraciones empleadas, los solventes utilizados y los diámetros de halo observados en cada una de las cepas tratadas con estos estímulos. A modo de ejemplo, en la Figura 51 se muestran los halos de inhibición de algunos de estos compuestos como el SDS, la neomicina, el EDTA y la caspofungina.

2.4.1. La neomicina, el EDTA, el cloruro de litio, el SDS, la difenilhidramina, el cloruro de cobalto, el cloruro de zinc y el clotrimazol activan la ruta CWI

Para confirmar el efecto activador sobre la ruta de integridad celular de la neomicina, el EDTA, el LiCl, el SDS, la difenilhidramina, el CoCl_2 , el ZnCl_2 y el clotrimazol (no incluimos en este análisis el ortovanadato sódico, la caspofungina, ni la alcalinización del medio al estar ya descritos como activadores de la ruta CWI), analizamos la fosforilación de Slt2 en los extractos proteicos de la cepa silvestre y la que porta el IPAC en un vector centromérico, tratadas con estos compuestos. En este ensayo utilizamos como control positivo extractos de células tratadas

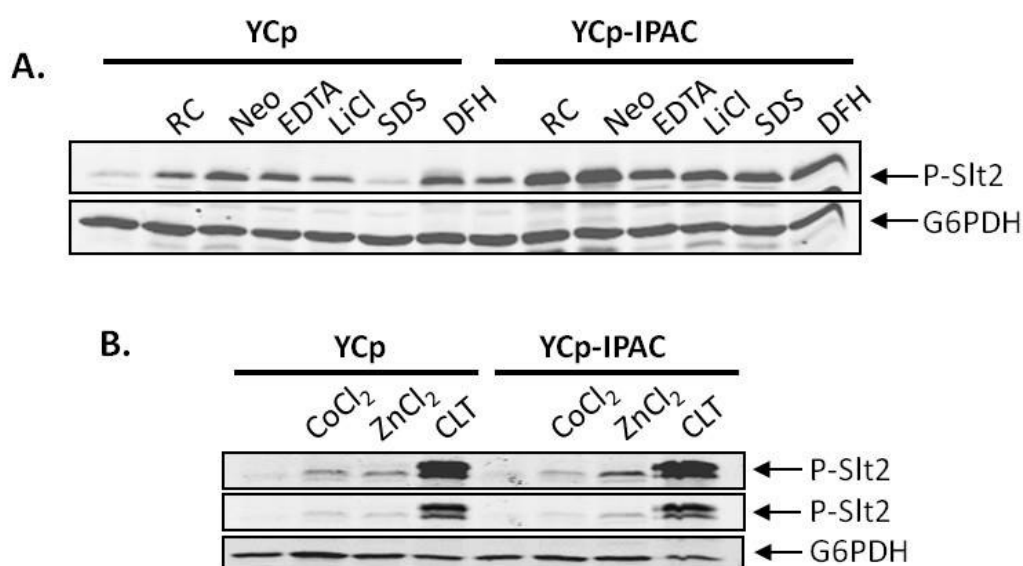


Figura 52: Análisis de la fosforilación de Slt2 en presencia de los compuestos identificados en los ensayos de halo. **A.** *Western blotting* para detectar la forma fosforilada de Slt2 en la cepa silvestre BY4741 transformada con el vector vacío (YCplac111) y el vector que contiene el IPAC (YCplac111-IPAC), tratadas durante 4 horas con rojo Congo (RC: 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), neomicina (Neo: 10 mg/ml), EDTA (50 mM), LiCl (200 mM), SDS (0,01%) y difenilhidramina (DFH: 10 mg/ml). **B.** *Western blotting* con las cepas del apartado A tratadas estas con CoCl_2 (5 mM), ZnCl_2 (5 mM) y clotrimazol (CLT: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se muestran dos exposiciones distintas.

con la concentración de rojo Congo utilizada habitualmente para activar la ruta CWI, y como control negativo, el extracto de un cultivo sin ningún tipo de estímulo. Como se observa en la Figura 52A, el tratamiento durante 4 horas con rojo Congo, neomicina, EDTA, LiCl y difenilhidramina induce una activación de la ruta CWI en una cepa silvestre y la presencia del

circuito provoca un incremento en la fosforilación de Slt2 en respuesta a estos estímulos. Sin embargo, la activación de la ruta CWI en respuesta a 0,01% de SDS solo es detectada en presencia del IPAC. Por otro lado, en la Figura 52B se muestra cómo el IPAC no provoca una amplificación significativa de la activación de la ruta en presencia de CoCl_2 , ZnCl_2 y clotrimazol ya que en presencia de este circuito la activación de la ruta es similar a la observada en la cepa silvestre. Además, tras el tratamiento con clotrimazol podemos observar la aparición de una banda adicional correspondiente a fosfo-Slt2, ya que es reconocida también por los anticuerpos anti-fosfo-MAPK, pero de menor movilidad electroforética.

2.4.2 Análisis del efecto del clotrimazol sobre la ruta CWI

2.4.2.1 *Comparación del efecto sobre la ruta CWI del clotrimazol con otros antifúngicos*

El clotrimazol es utilizado para tratar infecciones fúngicas ya que inhibe la lanosterol-14-desmetilasa, una enzima necesaria para la biosíntesis del ergosterol, componente fundamental de la membrana celular de los hongos (Helmick *et al.*, 2005). Para determinar si la activación de la ruta CWI era un efecto común provocado por otros azoles o exclusivo del clotrimazol, realizamos ensayos de halo de inhibición del crecimiento con clotrimazol, ketaconazol y miconazol en la cepa que tiene integrado el circuito, los mutantes *slt2Δ* y *gas1Δ* (que tiene la ruta CWI constitutivamente activa (de Nobel *et al.*, 2000)) y la cepa isogénica silvestre. Así pudimos observar cómo estos antifúngicos provocan halos de inhibición del crecimiento mayores y más nítidos en la cepa que porta el IPAC en relación a la cepa silvestre (Figura 53A). En el mutante *slt2Δ*, los halos generados por el clotrimazol y el miconazol son menores a los de la cepa IPAC y en presencia de ketaconazol la inhibición del crecimiento es similar en ambas cepas. En el caso del mutante *gas1Δ*, la inhibición del crecimiento en presencia de clotrimazol y ketaconazol es mayor que la observada en el resto de las cepas pero, en presencia de miconazol, este mutante presenta un comportamiento similar al de la cepa IPAC (Figura 53A).

Sin embargo, analizamos la activación de Slt2 en presencia de estos compuestos por medio de *Western blotting* y, como observamos en la Figura 53B, sólo el clotrimazol activa la ruta CWI en la cepa silvestre y provoca la aparición de la doble banda tanto en ausencia como en presencia del circuito. Además, en presencia del circuito, el ketaconazol es capaz de provocar un incremento en la fosforilación de la MAPK de la ruta de integridad celular que no se observa en la cepa sin el IPAC.

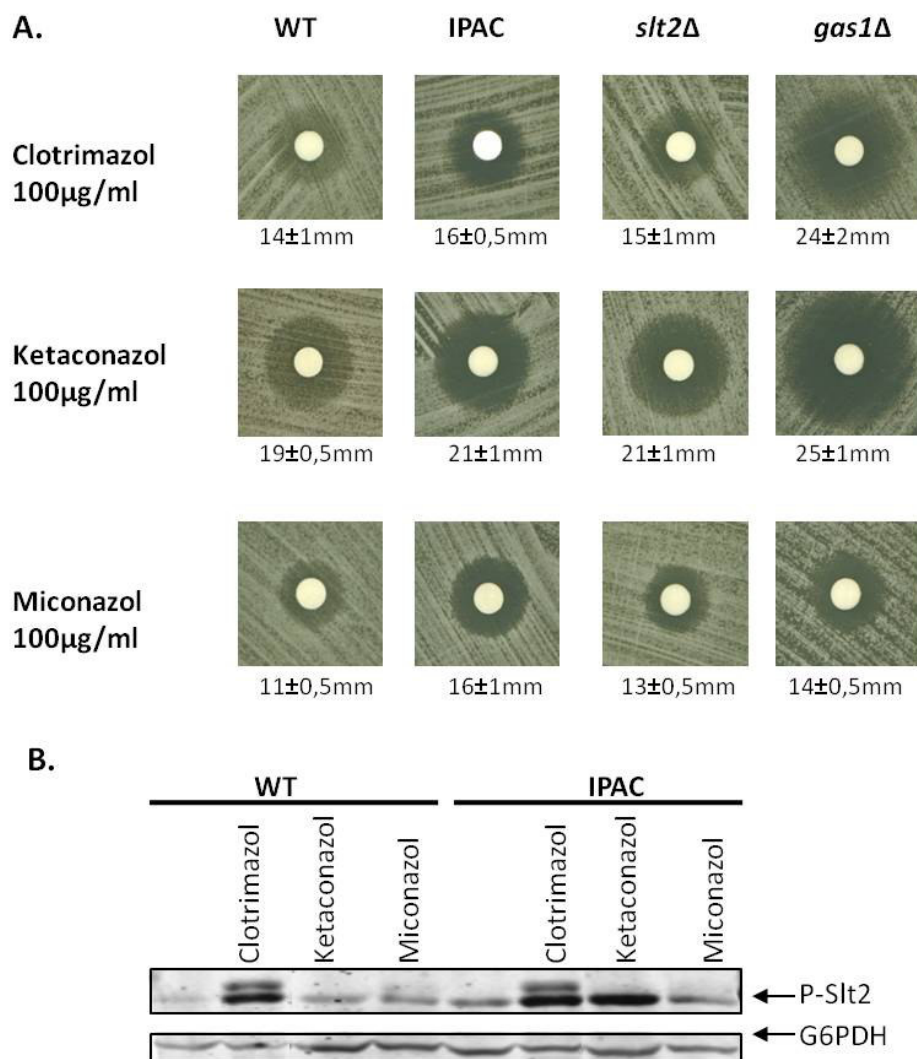


Figura 53: Comparación del efecto sobre la ruta CWI del clotrimazol con otros antifúngicos. A. Ensayo de halo de inhibición del crecimiento en la cepa que presenta el circuito genético integrado en el genoma (YSTH2), el mutante *slt2Δ* (YSTH4), el mutante *gas1Δ* (YSTH25) y la cepa isogénica silvestre (YSTH1), utilizando discos de 6mm de diámetro impregnados con 20μl de 100μg/ml de clotrimazol, ketaconazol y miconazol. **B.** Estudio mediante *Western blotting* de la activación de la ruta CWI en la cepa silvestre (YSTH1) y la que presenta el IPAC (YSTH2) en presencia de 50μg/ml de clotrimazol, ketaconazol y miconazol. La forma doblemente fosforilada y por tanto activa de Slt2 se detectó utilizando anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH se utilizó como control de carga.

2.4.2.2. En ausencia de Slt2 el clotrimazol induce la fosforilación de Hog1

Con el fin de caracterizar la cinética de activación de la ruta CWI en presencia de clotrimazol y analizar la activación de otras rutas de MAPKs de *S. cerevisiae*, estudiamos en una cepa silvestre la fosforilación de Slt2, Hog1, Kss1 y Fus3 a lo largo del tiempo en respuesta a clotrimazol. Como se muestra en la Figura 54, la fosforilación de Slt2 se observa a los 20 minutos tras el tratamiento con clotrimazol y aumenta a lo largo del tiempo, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *hog1Δ*, aunque la aparición de la doble banda no se manifiesta claramente

hasta las 4 horas en ambas cepas. Esto descarta la participación de la MAPK Hog1 en este fenómeno. En cuanto a la ruta de crecimiento filamentosos o invasivo, a diferencia de lo que ocurre con el rojo Congo que induce la fosforilación de Kss1, el tratamiento durante 4 horas con clotrimazol provoca una disminución en la fosforilación de esta MAPK, tanto en la cepa silvestre como en los mutantes *hog1Δ* y *slt2Δ*. De igual modo, la MAPK de la ruta de apareamiento (Fus3), experimenta una reducción en sus niveles de fosforilación en presencia de clotrimazol a las 4 horas en las 3 cepas estudiadas. Además observamos cómo en la cepa silvestre el clotrimazol no provoca la activación de la ruta HOG. Sin embargo, en el mutante *slt2Δ*, la fosforilación de Hog1 experimenta un incremento a lo largo del tiempo en presencia de este compuesto, lo que indica que, en ausencia de Slt2, el clotrimazol activa la ruta de respuesta a alta osmolaridad.

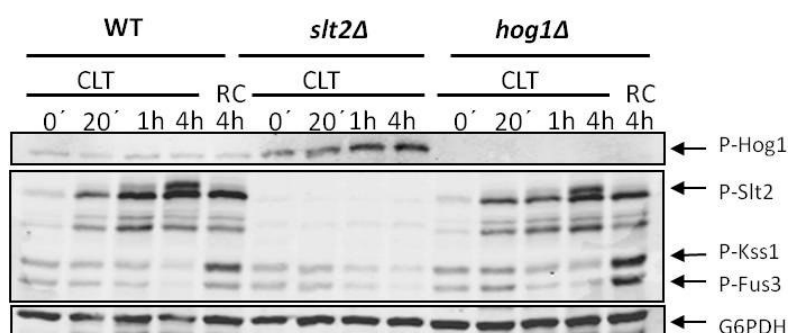


Figura 54: Estudio del efecto del clotrimazol sobre diferentes rutas de MAPK. Western blotting de los extractos celulares de la cepa BY4741 y los mutantes *slt2Δ* (Y00993) y *hog1Δ* (Y02724) tratados con 50μg/ml de clotrimazol (CLT) durante 20 min, 1 y 4 horas o con 30μg/ml de rojo Congo durante 4 horas en los casos indicados. En la inmunodetección se ha utilizado el anticuerpo anti-fosfo p44/42 que reconoce la forma fosforilada de Slt2, Kss1 y Fus3, anti-fosfo-p38 para la forma fosforilada de Hog1 y anti-G6PDH como control de carga.

2.4.2.3. El cambio en la movilidad de Slt2 provocada por el clotrimazol es dependiente de su fosforilación por Mkk1/2 y de su propia actividad catalítica

Llegados a este punto quisimos conocer, por un lado, si la banda de menor movilidad que la esperada para Slt2 era la propia MAPK y para ello utilizamos anticuerpos que reconocen Slt2 tanto fosforilado como sin fosforilar; y por otro lado, si este efecto provocado por el clotrimazol era dependiente de la activación de Slt2 o de su propia actividad catalítica. Como se muestra en la Figura 55, en una cepa que presenta la versión silvestre de esta MAPK, la doble banda que es reconocida con los anticuerpos anti-MAPK fosforilada también lo es por el anticuerpo anti-Slt2. Sin embargo, tanto en cepas carentes del motivo de activación -Thr-X-Tyr- de Slt2 al estar mutadas la T190 y la Y192 a alanina (Lee *et al.*, 1993), como en cepas que no presentan actividad catalítica de esta MAPK al estar mutada la K54 del centro activo a fenilalanina (*slt2^{K54F}*) (Martín *et al.*, 1993), tras el tratamiento durante 4 horas con clotrimazol,

no se observa la banda superior ni con anticuerpos que detectan a la proteína ni con los que detectan la forma fosforilada de Slt2.

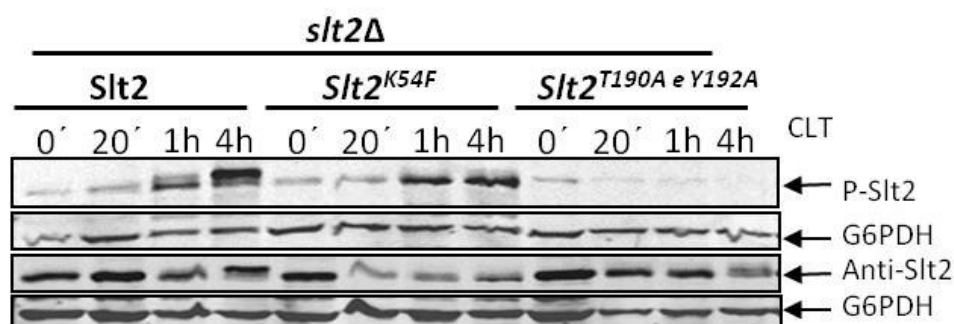


Figura 55: Efecto del clotrimazol en ausencia del motivo de activación -Thr-X-Tyr- de Slt2 o la actividad catalítica de esta MAPK. Western blotting para detectar la fosforilación de Slt2 con anticuerpo anti-fosfo p44/42 o los niveles de Slt2 con anticuerpos anti-Slt2 en lisados celulares de la cepa mutante YHR030C (*slt2Δ*) transformada con los plásmidos pRS316-SLT2, pRS316-*slt2*^{K54F} o pRS316-*slt2*^{T190A e Y192A} y tratada con 50μg/ml de clotrimazol (CLT) durante 20 min, 1 y 4 horas. El anticuerpo anti-G6PDH se utilizó como control de carga.

2.4.2.4. La mutación en el posible sitio de fosforilación por MAPKs de Slt2 no impide la aparición de la doble banda observada en presencia de clotrimazol

Analizando la secuencia aminoacídica de Slt2, encontramos que esta proteína sólo tiene un sitio susceptible de fosforilación por MAPKs (S/TP) correspondiente al aminoácido Thr 251. Mediante mutagénesis dirigida sustituimos en el plásmido pRS316-SLT2 este aminoácido por una alanina para estudiar mediante Western blotting si la doble banda detectada con los anticuerpos anti fosfo-MAPK era resultado de una fosforilación directa por parte de alguna MAPK. Como se observa en la Figura 56, la mutación del sitio T251 seguido por una prolina de Slt2 no altera la aparición de esta doble banda en respuesta a clotrimazol.



Figura 56: Estudio del efecto del clotrimazol sobre la versión de Slt2 no fosforilable por MAPKs. Western blotting de lisados celulares de la cepa mutante Y00993 (*slt2Δ*) transformada con los plásmidos pRS316-SLT2 o pRS316-*slt2*^{T251A} y tratada con 50μg/ml de clotrimazol durante 20 min, 1 y 4 horas. La fosforilación de Slt2 fue detectada con anticuerpo anti-fosfo p44/42 y anti-G6PDH se utilizó como control de carga.

2.4.2.5. La fusión de epítomos al extremo carboxi-terminal de Slt2 impide el cambio de movilidad provocada por el clotrimazol

Para determinar cómo afecta la fusión de distintos epítomos a Slt2 en el cambio de movilidad observado en presencia de clotrimazol, utilizamos versiones de Slt2 que presentan

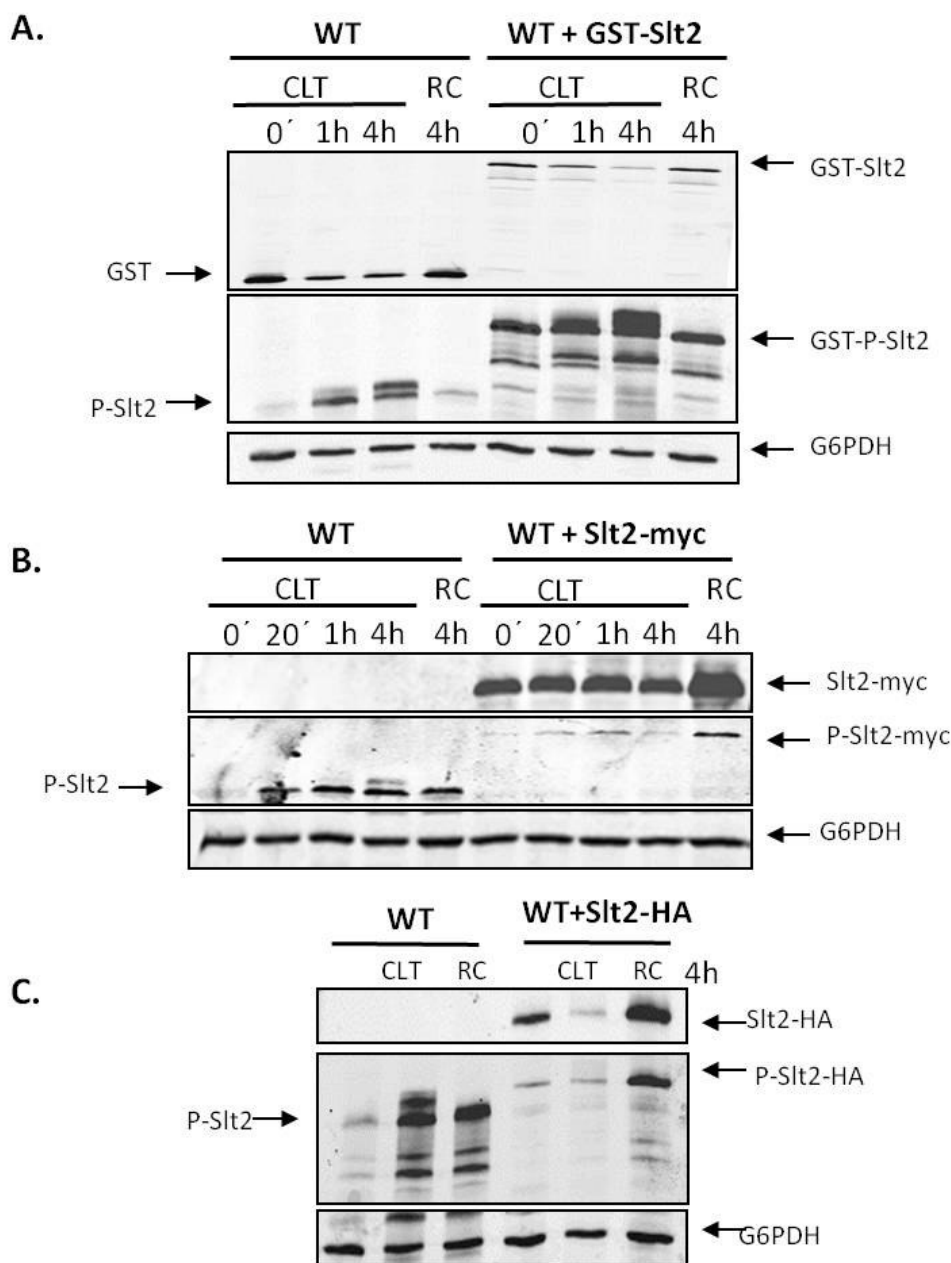


Figura 57: Efecto de la fusión a Slt2 de distintos epítomos en respuesta a clotrimazol. Inmunodetección de Slt2 fusionado a GST (A), myc (B) y HA (C) utilizando anticuerpos específicos para cada epítomo (paneles superiores), anti-fosfo-p44/42 para la forma doblemente fosforilada de Slt2 (paneles intermedios) y anti-G6PDH como control de carga (paneles inferiores), en extractos proteicos de la cepa BY4741 transformada con los plásmidos pEG(KG), pEG(KG)-SLT2, YCplac111-SLT2-HA o pRS305-SLT2-myc y tratadas con clotrimazol (50µg/ml) o rojo Congo (30µg/ml) según el tiempo indicado en cada panel. En el caso de GST-Slt2, como la construcción presenta el promotor *GAL*, fue necesario crecer las células en rafinosa durante toda la noche e inducir la expresión de GST-Slt2 en medio con galactosa.

GST en el extremo amino-terminal y myc o HA en el extremo carboxilo-terminal. Observamos cómo la fusión al extremo amino no afecta al cambio de movilidad observado en GST-Slt2 tras 4 horas con este estímulo (Figura 57A), pero las fusiones al extremo carboxilo de distintos epítomos impiden la aparición de una doble banda correspondiente a Slt2-myc (Figura 57B) o Slt2-HA (Figura 57C).

2.4.3. Análisis del efecto de la neomicina sobre la ruta CWI

2.4.3.1. *Estudio comparativo del efecto de la neomicina frente a otros inhibidores de síntesis proteica en relación a la ruta CWI*

Para determinar si la activación de la ruta CWI observada con neomicina se producía también con otros aminoglucósidos, realizamos ensayos de halo de inhibición del crecimiento en la cepa con el IPAC integrado en el genoma, los mutantes *slt2Δ* y *gas1Δ* y la cepa isogénica silvestre, en presencia de neomicina, cicloheximida, estreptomycin, geneticina (G418), e higromicina.

En este ensayo aumentamos la concentración de neomicina, para obtener un halo mayor y observar mejor las diferencias entre las distintas cepas, y también la de estreptomycin y G418, ya que estos compuestos se probaron en el rastreo inicial de activadores de la ruta, sin observarse ninguna diferencia en ausencia o presencia del circuito. En este análisis también incluimos la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica que en organismos eucariotas actúa interfiriendo con la actividad peptidil transferasa de los ribosomas 60S bloqueando la elongación traduccional (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010). Como se observa en la Figura 58, sólo la neomicina provoca un halo de inhibición del crecimiento significativamente mayor en la cepa que porta el IPAC en comparación tanto con la cepa silvestre como con el mutante *slt2Δ* o con el mutante *gas1Δ*. La estreptomycin, al igual que la cicloheximida, solo provoca inhibición del crecimiento en el mutante *slt2Δ* aunque la sensibilidad de este mutante es muy distinta frente a estos dos compuestos, observándose un gran halo de inhibición en presencia de cicloheximida y uno mucho menor con estreptomycin. El efecto de G418 y de la higromicina sobre el crecimiento de la cepa silvestre, la que porta el IPAC y el mutante *slt2Δ* es similar y en el mutante *gas1Δ* provoca una mayor inhibición del crecimiento.

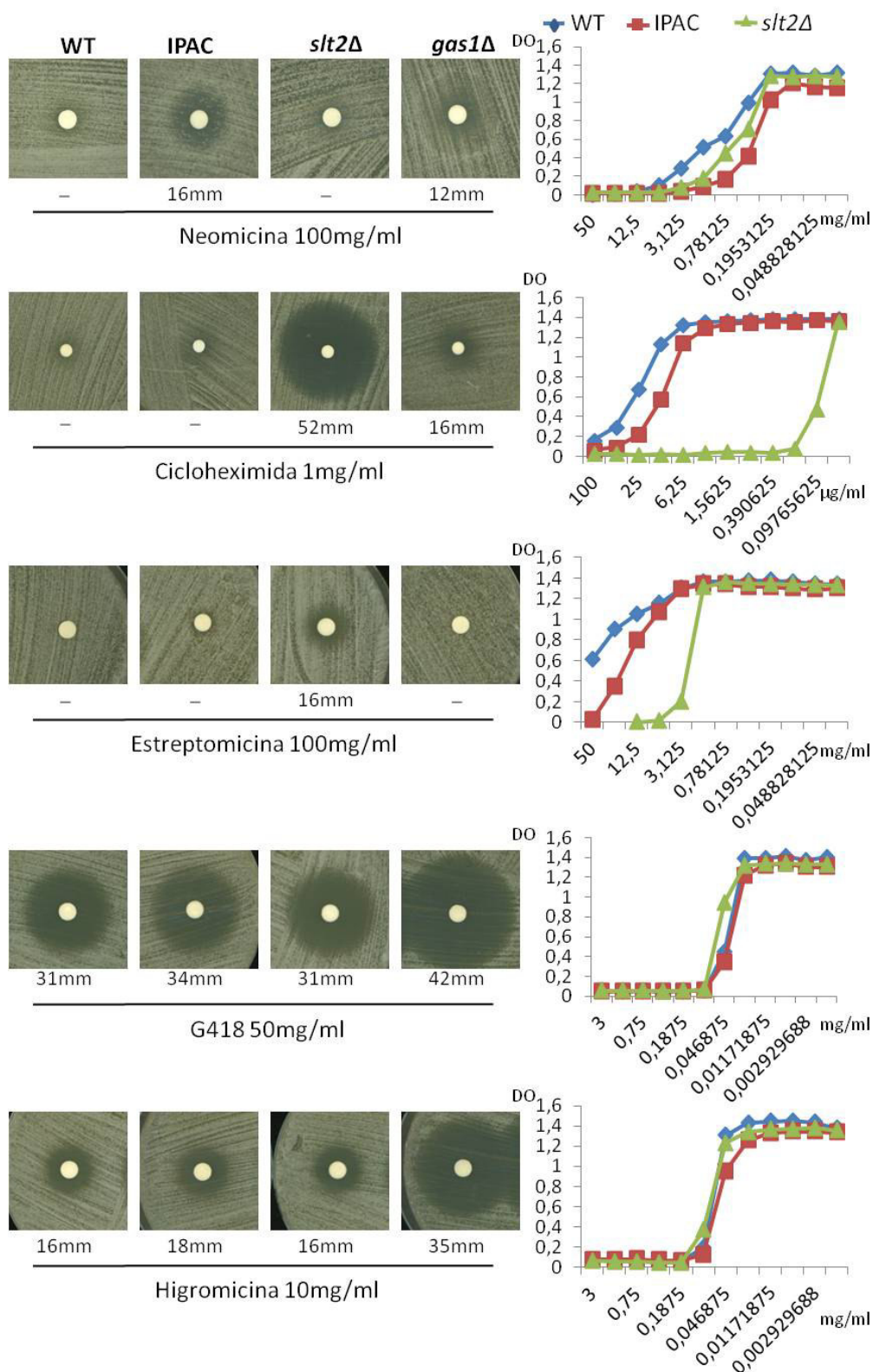


Figura 58: Sensibilidad a distintos inhibidores de síntesis proteica. Ensayo de halo de inhibición del crecimiento en la cepa que presenta el IPAC (YSTH2), los mutantes *slt2Δ* (YSTH4) y *gas1Δ* (YSTH25) y la cepa isogénica silvestre (YSTH1), utilizando discos de 6mm de diámetro impregnados con 20μl de neomicina, estreptomicina, G418, higromicina y cicloheximida. A la derecha se muestra la determinación de las CMI de cada uno de estos compuestos en las cepas YSTH1, YSTH2 e YSTH4.

En paralelo analizamos la sensibilidad a estos compuestos en medio líquido de la cepa que porta el circuito IPAC, el mutante *slt2Δ* y la cepa isogénica silvestre, obteniéndose resultados congruentes con los obtenidos en los ensayos de halo. Observamos que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de neomicina es menor en presencia del IPAC en relación con las otras cepas. El mutante *slt2Δ*, en comparación con la cepa que porta el circuito y la silvestre, presenta mayor sensibilidad a cicloheximida y estreptomicina, mientras que el comportamiento de estas tres cepas es similar tanto en presencia de G418 como de higromicina (Figura 58).

La ausencia de una mayor sensibilidad en la cepa que porta el circuito IPAC en presencia de estreptomicina, G418, cicloheximida e higromicina, no descarta que estos compuestos no puedan provocar una activación de la ruta CWI, pero que la señal no sea transmitida por Rlm1, lo cual no produciría la retroalimentación del circuito. En tal caso se observaría un incremento en la fosforilación de Slt2 tras el tratamiento con estos compuestos. Por ello decidimos analizar por *Western blotting* los extractos proteicos de una cepa silvestre tratada durante 4 horas con neomicina, estreptomicina, G418, cicloheximida e higromicina utilizando las concentraciones mínimas inhibitorias de la cepa silvestre en cada uno de los casos. Como se observa en la Figura 59, solo la neomicina provoca un incremento significativo en la fosforilación de Slt2 en relación a las células sin tratar con ningún compuesto.

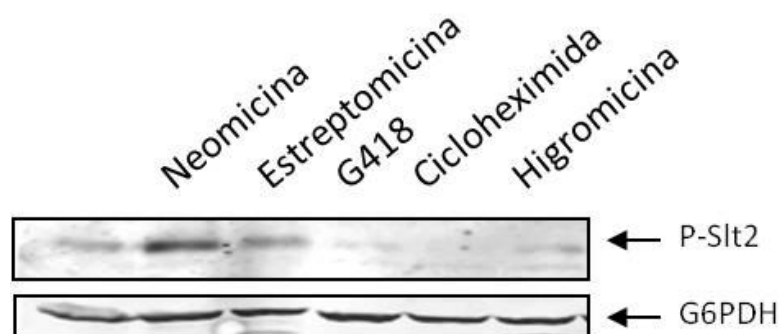


Figura 59: Efecto de distintos inhibidores de síntesis proteica sobre la activación de la ruta CWI. La activación de la ruta CWI fue analizada por *Western blotting* en la cepa YSTH1 tratada con 10mg/ml de neomicina, 60mg/ml de estreptomicina, 100μg/ml de cicloheximida, 100μg/ml de G418 y 150μg/ml de higromicina. Los anticuerpos utilizados fueron anti-fosfo-p44/42 para Slt2, y anti-G6PDH para control de carga.

2.4.3.2. La neomicina provoca fragmentación vacuolar y acelera el proceso de entrada de FM4-64 hacia las vacuolas

Debido a que está descrito que la neomicina se une a fosfoinosítidos y lípidos de membranas (Schacht, 1978; Lodhi *et al.*, 1979) e *in vitro* inhibe la fusión vacuolar de las levaduras (Mayer *et al.*, 2000) y de eucariotas superiores (Jost *et al.*, 1998), quisimos comprobar si en una cepa silvestre, este aminoglucósido también alteraba este proceso *in vivo*. Para estudiar la ruta endocítica utilizamos el colorante vital FM4-64 (Vida y Emr, 1995) que se une a los lípidos de la membrana plasmática y se introduce al interior mediante endocitosis incorporándose posteriormente a vesículas endocíticas hasta la membrana vacuolar. Como se observa en la Figura 60, en presencia de neomicina, el colorante se introduce de forma más rápida y a tiempos cortos (30 min) no marca la membrana plasmática, a diferencia de lo que ocurre en ausencia de este aminoglucósido. Además observamos cómo a las 2 horas con el colorante, en presencia de neomicina se observa un incremento en el número de vacuolas por célula.

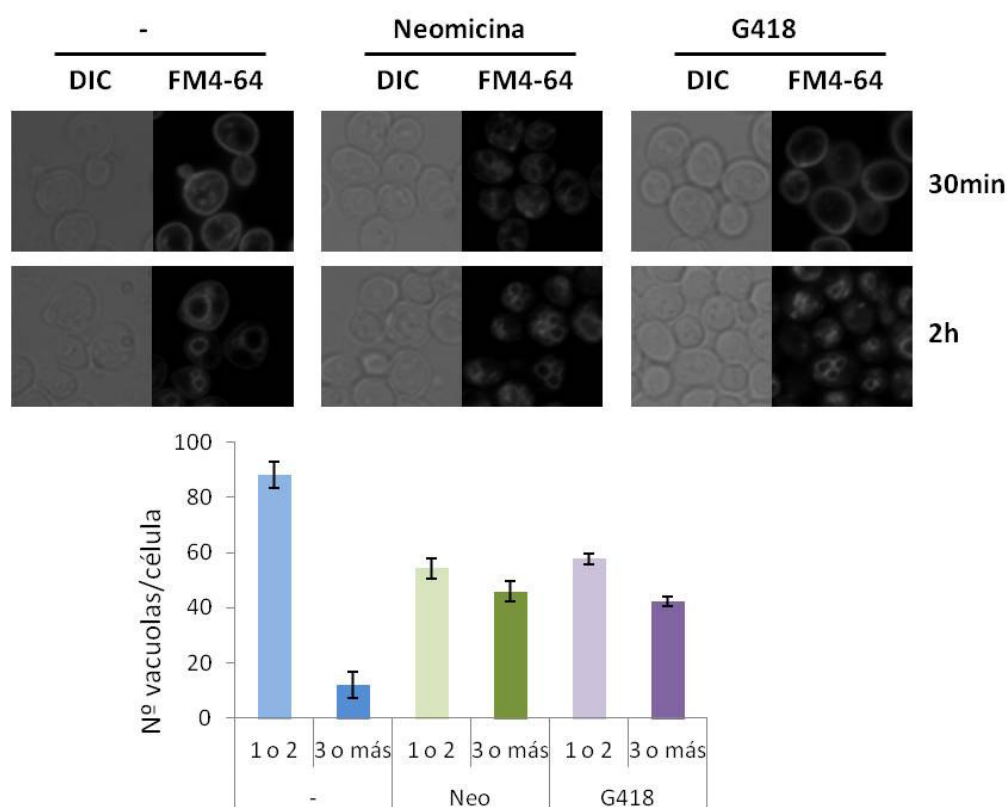


Figura 60: Análisis del efecto de la neomicina y la geneticina sobre la ruta endocítica. Imágenes DIC y de microscopía de fluorescencia que muestran las membranas vacuolares teñidas con el colorante vital FM4-64 de la cepa silvestre YSTH1 tratada o sin tratar durante 4 horas con 1mg/ml de neomicina o 0,01mg/ml de geneticina (G418). Las imágenes están tomadas a los 30 min y 2 horas en presencia de FM4-64 a 30°C. La gráfica muestran el número de vacuolas por célula en cada una de las condiciones y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias en el número de vacuolas por célula en presencia de neomicina y G418 son estadísticamente significativas con un $p\text{-value} \leq 0,005$.

Además quisimos saber si estos efectos observados eran exclusivos de la neomicina u ocurrían también en presencia de otros aminoglucósidos y tratamos las células en paralelo con geneticina. En presencia de G418 y tras tratar las células durante 30 minutos con FM4-64 observamos cómo este colorante marca la membrana plasmática, al igual que en la cepa control, pero tras 2 horas con el FM4-64, se observa un incremento en el número de vacuolas por célula, al igual que ocurre con la neomicina (Figura 60).

2.4.3.3. *La neomicina no altera el citoesqueleto de actina*

Por último, mediante tinción celular con rodamina-faloidina estudiamos los parches de actina ya que son lugares donde se produce la endocitosis y observamos cómo en una cepa silvestre, la neomicina no altera este proceso apareciendo parches de actina en las yemas en crecimiento (Figura 61).

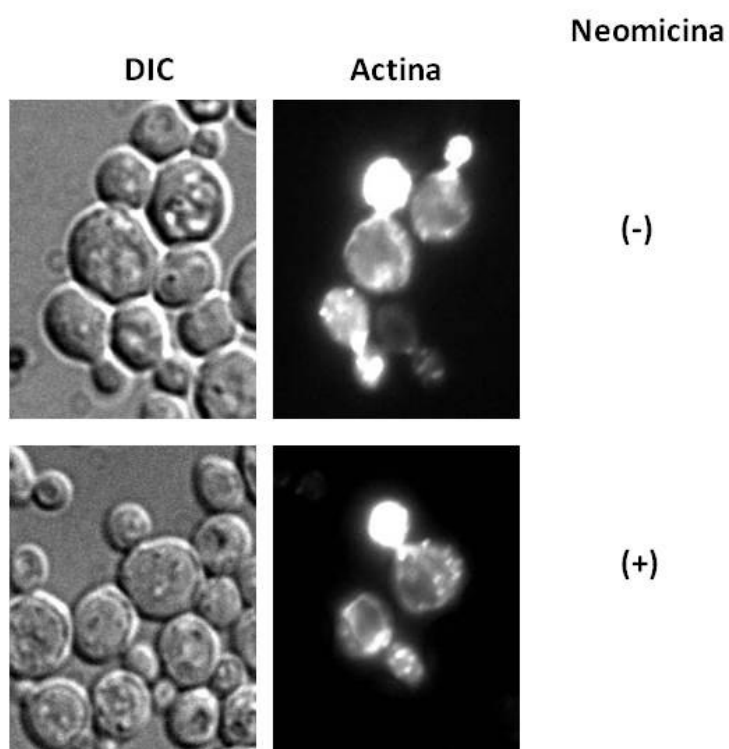


Figura 61: Análisis del efecto de la neomicina sobre el citoesqueleto de actina. Imágenes de DIC y microscopía de fluorescencia de la cepa YSTH1 tratada o sin tratar durante 4 horas con 10mg/ml de neomicina y teñidas con rodamina-faloidina para así visualizar los parches de actina.

2.4.3.4. Estudio de la sensibilidad a neomicina de mutantes relacionados con la pared celular, la ruta CWI y la ruta HOG

Posteriormente nos propusimos identificar los componentes necesarios para transmitir la señal hacia Slt2 en presencia de este aminoglucósido. Debido a que los mutantes no esenciales de la colección genómica de *Euroscarf* tienen los genes interrumpidos con la *cassette* de kanamicina y existe resistencia cruzada con la neomicina, fue necesario utilizar mutantes interrumpidos con el gen de resistencia al antibiótico nourseotricina. En este estudio, además de analizar la ruta de integridad celular, decidimos estudiar la ruta de respuesta a alta osmolaridad que, como hemos comentado anteriormente, aunque responde principalmente a estrés osmótico, participa en la transmisión de la señal hacia Slt2 en respuesta a zimoliasa (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009; Bermejo *et al.*, 2010). También incluimos las proteínas quinasas asociadas a lípidos de membrana: Pkh1 y 2 que, en respuesta a un choque térmico, fosforilan Pkc1 (Inagaki *et al.*, 1999) y la proteína fosfatasa Ptc1 y su proteína adaptadora Nbp2 que actúan sobre las rutas HOG y CWI (Tatjer *et al.*, 2016). Por último analizamos el papel en la respuesta a neomicina de las proteínas de unión al fosfoinosítido PIP₂, Slm1 y Slm2, que regulan el citoesqueleto de actina en respuesta a diversos estreses (Audhya *et al.*, 2004), así como el de algunas proteínas responsables de la biosíntesis de la pared celular (Chs3, Gas1 y Kre6).

Para analizar de una manera rápida y sencilla un amplio número de mutantes, realizamos ensayos de crecimiento sembrando diluciones decimales seriadas de las células en placas que contenían varias concentraciones de neomicina, comparándolas siempre con la cepa silvestre y con el comportamiento de los mutantes en placas de rojo Congo. Como se observa en la Figura 62, de los dos sensores de la ruta CWI que analizamos, solo el mutante *wsc1Δ* muestra sensibilidad a neomicina, al igual que *slt2Δ*, *bck1Δ*, *rom2Δ*, *swi4Δ* y *swi6Δ*. Todos estos mutantes muestran también sensibilidad a rojo Congo excepto en el caso de *swi6Δ*, que es tan resistente al daño en pared provocado por este agente como la cepa isogénica silvestre. De los componentes de la ruta de respuesta a alta osmolaridad, *hog1Δ* presenta mayor inhibición del crecimiento en presencia de este aminoglucósido, aunque tanto *pbs2Δ* como *opy2Δ* también muestran cierta sensibilidad, siendo todos estos mutantes resistentes a rojo Congo como la cepa isogénica silvestre. De las proteínas involucradas en la biogénesis de la pared celular, tanto la falta de Gas1 como de Kre6 incrementan la sensibilidad a neomicina y rojo Congo. En cuanto a Pkh1/2, solo el mutante *pkh2Δ* muestra cierta inhibición del crecimiento en presencia de neomicina. Sin embargo estas quinasas se comportan igual en respuesta a rojo Congo siendo ambos mutantes resistentes a este estímulo a la concentración ensayada. En el caso de Ptc1 y

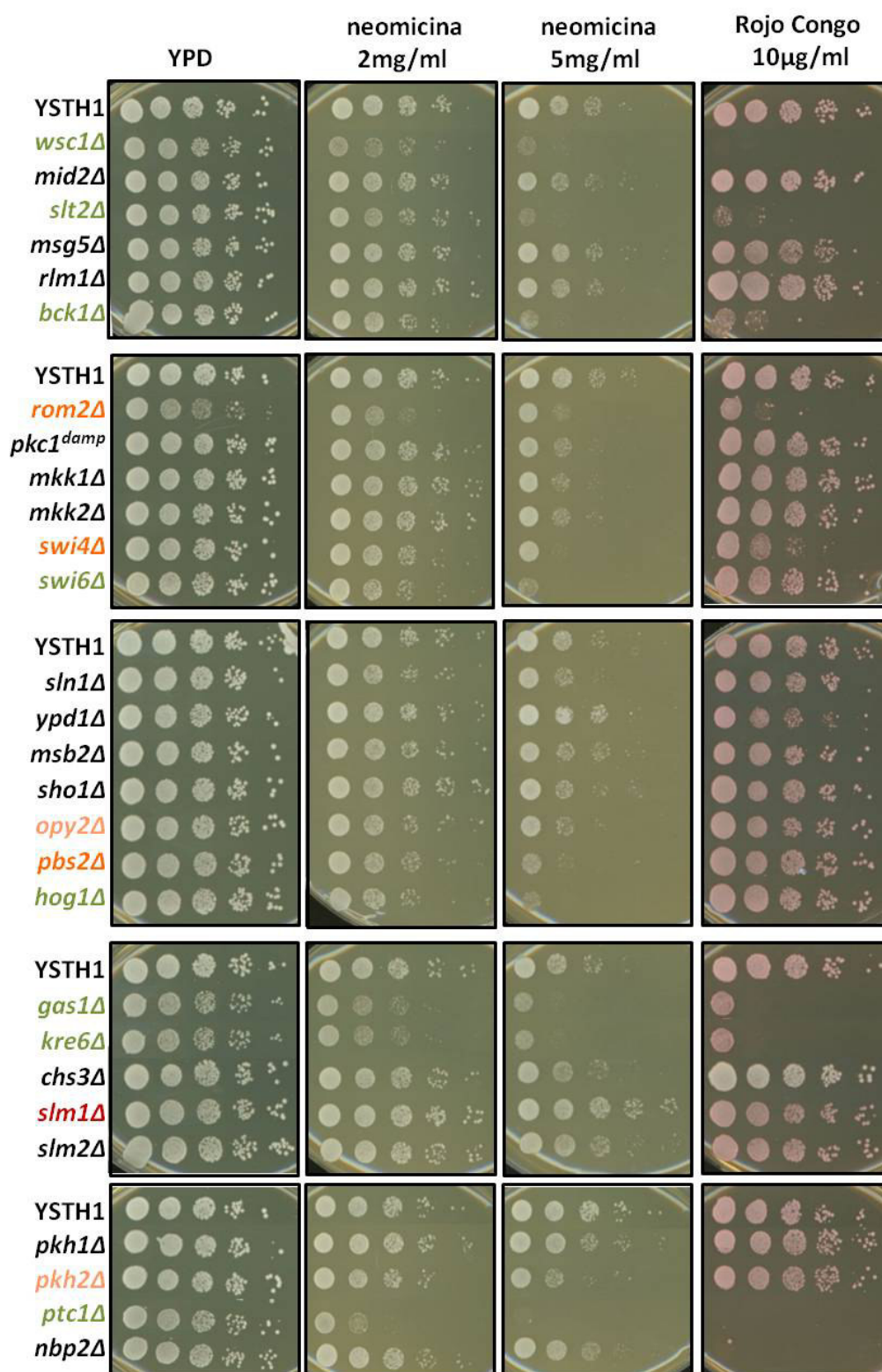


Figura 62: Estudio de sensibilidad a neomicina en mutantes deficientes en componentes de la ruta CWI, HOG y Pkh1/2 o deficientes en la biogénesis de la pared. Ensayo de crecimiento en gotas de diluciones decimales seriadas de los mutantes indicados en la figura e interrumpidos con neomicina, en placas con 2 o 5mg/ml de neomicina o 10µg/ml de rojo Congo. La gradación de colores indica el grado de sensibilidad a neomicina, siendo el verde el de máxima sensibilidad, en naranja aparecen los que presentan sensibilidad intermedia y en rosa los leves. *slm1Δ* aparece en rojo para indicar su resistencia a neomicina.

Nbp2, tampoco responden igual a neomicina y rojo Congo ya que la ausencia de estas dos proteínas hace a las cepas sensibles a rojo Congo pero solo *ptc1Δ* es sensible a neomicina. Por último hay que señalar el comportamiento del mutante *slm1Δ* el cual muestra cierta resistencia a este aminoglucósido, creciendo mejor que la cepa silvestre, pero ambas cepas son igual de resistentes a rojo Congo, mientras que el mutante *slm2Δ* se comporta como la cepa silvestre en presencia de ambos compuestos (Figura 62).

2.4.3.5. Identificación de proteínas implicadas en la activación de la ruta CWI en respuesta a neomicina

En todos aquellos mutantes sensibles a la neomicina y otros relacionados con éstos, estudiamos la activación de la ruta de integridad celular analizando la fosforilación de Slt2 en respuesta a neomicina (Figura 63A). Solo en los mutantes *slt2Δ* y *bck1Δ* se elimina totalmente la fosforilación de Slt2. En cuanto a *wsc1Δ* y *mid2Δ* comprobamos que, aunque solo *wsc1Δ* muestra sensibilidad a neomicina, la delección de ninguno de estos sensores altera la fosforilación de Slt2. En el mutante *rom2Δ* disminuye la fosforilación de Slt2 en presencia de neomicina, a diferencia de lo que ocurre en el mutante *msg5Δ*, en el que aumenta. En el mutante *Pkc1^{DAmP}* (un mutante que presenta menor cantidad de RNAm de *PKC1*), aunque en presencia de neomicina se observa un incremento en la fosforilación de Slt2, ésta es menor que la observada en una cepa silvestre. También confirmamos que Swi6, pero no Swi4, participa en la respuesta a neomicina, ya que solo este mutante presenta inhibición del crecimiento y disminución de los niveles de fosforilación de Slt2 tras el tratamiento con este aminoglucósido. En cuanto a las proteínas quinasas Pkh1/2 y las proteínas de unión a fosfoinosítidos Slm1/2, la delección de Pkh1 es la que más reduce la fosforilación de Slt2 en presencia de este aminoglucósido. De la ruta de respuesta a alta osmolaridad analizamos la fosforilación de Slt2 frente a la neomicina en los mutantes delecionados en el osmosensor Opy2, la MAPK Hog1, la MAPKK Pbs2, así como en la fosfatasa Ptc1 y su adaptador Nbp2, que también actúan sobre la ruta CWI (Figura 63B). En alguno de estos casos comparamos esta respuesta con la mostrada en presencia de rojo Congo. Sólo en los mutantes *hog1Δ*, *pbs2Δ* y *nbp2Δ* observamos cierta disminución en los niveles de fosforilación de Slt2 en presencia de neomicina. Por último, en mutantes deficientes en la biosíntesis de glucanos como *gas1Δ* y *kre6Δ*, los niveles de fosfo-Slt2 con neomicina son superiores a los de una cepa silvestre y similares a los que tienen estos mutantes constitutivamente, mientras que en el mutante deficiente en quitina *chs3Δ*, la neomicina activa la ruta CWI como en una cepa silvestre.

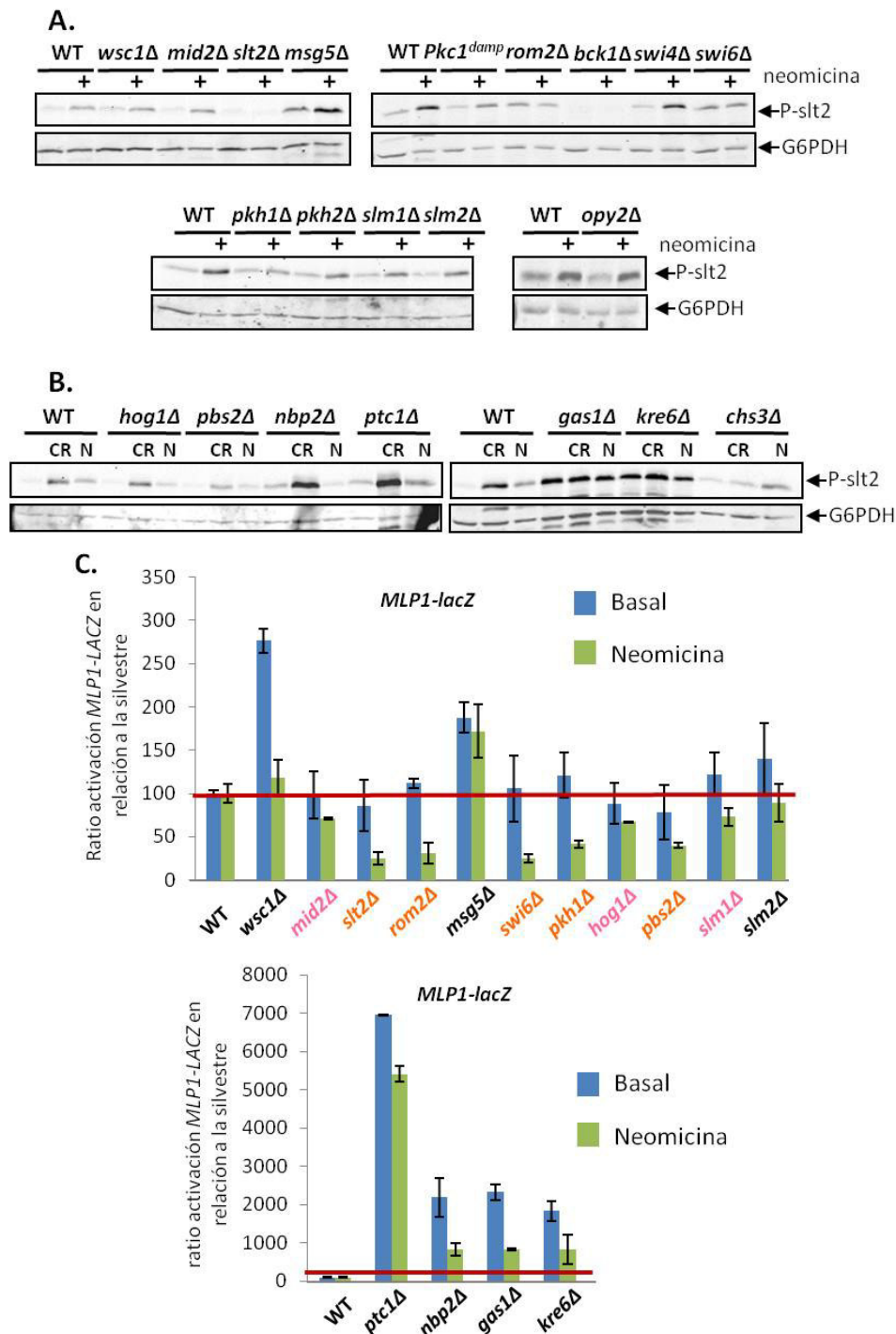


Figura 63: Activación de la ruta CWI en respuesta a neomicina en mutantes deficientes en componentes de la ruta CWI, HOG y Pkh1/2 o deficientes en la biogénesis de la pared. *Western blotting* de extractos proteicos de los mutantes indicados tratados con 10mg/ml de neomicina durante 4h (A y B) y 30μg/ml de rojo Congo (B). C. Ensayos de actividad β-galactosidasa de lisados celulares expresando el gen reportero *lacZ* bajo el control de *MLP1* (YEp352-*pMLP1-lacZ*). Las células fueron tratadas con 10mg/ml de neomicina durante 4h. En las gráficas se representan los valores medios y la desviación estándar de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa silvestre sin y con neomicina a la que se asigna el valor de 100%. Las diferencias en presencia de neomicina son estadísticamente significativas con un $p\text{-value} \leq 0,05$ en todos los casos menos en los mutantes *wsc1Δ*, *mid2Δ*, *slm2Δ* y *kre6Δ*. La gradación de colores indica el grado de reducción de la activación transcripcional de la ruta, siendo naranja el mayor.

En aquellos mutantes que mostraron una disminución en los niveles de fosforilación de Slt2 en presencia de neomicina, realizamos ensayos de β -galactosidasa para analizar la inducción transcripcional del gen reportero *MLP1-lacZ* desencadenada por el tratamiento con este aminoglucósido. Como era de esperar, en los mutantes *slt2Δ*, *rom2Δ* y *swi6Δ* se observa una reducción en la activación de la ruta CWI en presencia de neomicina por debajo del 50% con relación a la cepa silvestre. Además también se observa un bloqueo en la inducción transcripcional de *MLP1* en respuesta a neomicina en los mutantes *pkh1Δ* y *pbs2Δ*. En cuanto a la fosfatasa Ptc1 y a su adaptador Nbp2, solo Nbp2 parece estar participando en la transmisión de la señal hacia *MLP1* en respuesta a este aminoglucósido. Con relación a los mutantes en la biogénesis de la pared *gas1Δ* y *kre6Δ* presentan reducida la activación de la ruta CWI en presencia de neomicina con relación a su activación basal, aunque en *kre6Δ* la reducción no es estadísticamente significativa (Figura 63C).

2.4.3.6. Estudio de la respuesta transcripcional global a neomicina

Para conocer el perfil transcripcional global en respuesta a neomicina, realizamos un análisis transcriptómico utilizando *microarrays* de DNA en los que se comparó la expresión de genes en la cepa silvestre BY4741 tratada durante 4 horas con neomicina frente a la misma cepa sin tratamiento. En estas condiciones se produce la inducción de 84 genes por encima de 1,7 veces más que en las células no tratadas ($p\text{-value} \leq 0,05$) (Tabla 9) y la represión de 21 genes 0,6 veces menos ($p\text{-value} \leq 0,05$) (Tabla 10).

Tabla 9: Clasificación funcional de los genes diferencialmente inducidos más de 1,7 veces en presencia de neomicina con respecto al control. La agrupación en categorías funcionales se realizó de acuerdo a la herramienta bioinformática *Go Term Finder*. Los ratios corresponden al valor medio de inducción obtenidos en tres réplicas biológicas y todos los valores son estadísticamente significativos según la prueba *t-student* ($p \leq 0,05$), aplicada para el análisis de datos.

Respuesta a estrés			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YDR034W-B		3,25	Se localiza en la periferia celular y puede estar relacionada con respuesta a estrés.
YFL014W	<i>HSP12</i>	2,72	Proteína regulada por Hog1 necesaria para el mantenimiento de la membrana en situaciones de estrés como choque térmico, estrés oxidativo, depleción de glucosa, osmoestrés, fase estacionaria.
YOL052C-A	<i>DDR2</i>	2,61	Proteína de respuesta a múltiples estreses.
YDR070C	<i>FMP16</i>	2,31	Función desconocida aunque propuesta como involucrada en respuesta a condiciones de estrés.
YCR021C	<i>HSP30</i>	2,23	Proteína de respuesta a estreses tales como: choque térmico, etanol, limitación de glucosa o entrada en fase estacionaria.

YDR043C	<i>NRG1</i>	2,2	Media represión por glucosa y regula negativamente procesos relacionados con el crecimiento filamentoso y la respuesta a pH alcalino.
YPR036W-A		2,18	Proteína involucrada en esporulación, fosforilada durante la meiosis
YGR088W	<i>CTT1</i>	2,14	Necesaria para la protección de daño oxidativo por peróxido de hidrógeno
YKL161C	<i>MLP1</i>	2,08	Pseudoquinasa paróloga de Slt2, implicada en la ruta CWI
YGL166W	<i>CUP2</i>	1,98	Factor de transcripción que se activa en respuesta a elevadas concentraciones de cobre
YMR107W	<i>SPG4</i>	1,94	Proteína necesaria para sobrevivir a altas temperaturas durante la fase estacionaria
YER053C-A		1,9	Proteína del retículo endoplasmático que aumenta en respuesta a estrés de DNA
YJR008W	<i>MHO1</i>	1,84	Inducida por estrés térmico
YOR208W	<i>PTP2</i>	1,83	Tirosín fosfatasa que inactiva Hog1, Fus3 y Slt2
YLR205C	<i>HMX1</i>	1,81	Implicada en la respuesta a estrés oxidativo
YER037W	<i>PHM8</i>	1,79	Fosfatasa de ácido lisfosfatídico relacionada con la falta de glucosa.
YHR030C	<i>SLT2</i>	1,77	MAPK de la ruta CWI
YEL060C	<i>PRB1</i>	1,72	Proteinasa B vacuolar relacionada con degradación de proteínas en las vacuolas durante esporulación
Biosíntesis de aminoácidos/proteínas			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YGL184C	<i>STR3</i>	7,27	Cistationina β liasa que convierte cistationina en homocisteína
YOL058W	<i>ARG1</i>	6,12	Arginosucinato sintetasa
YJL088W	<i>ARG3</i>	4,49	Implicada en la síntesis de arginina
YJR109C	<i>CPA2</i>	2,91	Carbomil fosfato sintasa que sintetiza citrulina, precursor de arginina
YCR005C	<i>CIT2</i>	2,73	Citrato sintasa implicada en el ciclo del glioxilato
YMR062C	<i>ARG7</i>	2,60	Ornitina acetiltransferasa mitocondrial que cataliza el paso final en la síntesis de arginina
YNL277W	<i>MET2</i>	2,49	L-homoserina-O-acetil-transferasa que cataliza el primer paso en la síntesis de metionina
YHR018C	<i>ARG4</i>	2,48	Arginosucinato liasa que cataliza el últimos paso en la bisíntesis de arginina
YER175C	<i>TMT1</i>	2,43	Trans-aconitato metil-transferasa implicada en la síntesis de leucina
YLR327C	<i>TMA10</i>	2,32	Relacionada con ribosomas
YER069W	<i>ARG5,6</i>	2,26	Quinasa involucrada en la síntesis de arginina
YIR017C	<i>MET28</i>	2,12	Activador transcripcional que participa en la regulación del metabolismo de sulfuro.
YER081W	<i>SER3</i>	2,05	3-fosfoglicerato deshidrogenasa implicada en la síntesis de serina y glicina
YOR302W		2,02	Regula la transducción del RNAm de la carbomil fosfato sintasa que sintetiza un precursor de la arginina
YKL001C	<i>MET14</i>	1,89	Adenilsulfato quinasa requerida para la asimilación de sulfato y la síntesis de metionina
YFR030W	<i>MET10</i>	1,83	Subunidad alfa de la enzima sulfito reductasa
YMR251W	<i>GTO3</i>	1,82	Glutación transferasa de la clase omega
YER091C	<i>MET6</i>	1,8	Proteína necesaria para la síntesis de metionina
YIR034C	<i>LYS1</i>	1,8	Deshidrogenasa que cataliza el último paso de la síntesis de lisina
YOR222W	<i>ODC2</i>	1,76	Transportador de la membrana interna mitocondrial necesaria para el metabolismo de lisina y glutamato
YOR303W	<i>CPA1</i>	1,75	Subunidad pequeña de la carbamoyl fosfato sintetasa que cataliza la síntesis de citrulina, precursor de arginina.
YOR130C	<i>ORT1</i>	1,72	Transportador de ornitina de la membrana mitocondrial interna que exporta ornitina para la biosíntesis de arginina

Biosíntesis de la pared celular			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YKL163W	<i>PIR3</i>	3,93	Proteína PIR de la pared celular necesaria para la estabilidad de ésta
YGR032W	<i>GSC2</i>	3,59	Subunidad catalítica de la β -1,3-glucan sintasa
YLR194C	<i>(FKS2)</i>	2,25	Proteína GPI de la pared celular
YLR121C	<i>YPS3</i>	1,89	Proteasa involucrada en el mantenimiento y crecimiento de la pared
YHR021W-A	<i>ECM12</i>	1,76	Función desconocida aunque puede contribuir a la biosíntesis de la pared ya que los mutantes son hipersensibles a zimoliasa.
YLR120C	<i>YPS1</i>	1,73	Proteasa involucrada en el mantenimiento y crecimiento de la pared celular
Señalización			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YOR134W	<i>BAG7</i>	5,20	GAP de la GTPasa Rho1 relacionada con la síntesis de la pared celular
YKR091W	<i>SRL3</i>	2,56	Proteína citoplasmática que suprime la letalidad de un mutante <i>rad53</i> . Sustrato potencial de Cdc28. (Rad53 es una quinasa implicada en respuesta a daño DNA)
YMR316W	<i>DIA1</i>	2,3	Relacionada con el crecimiento invasivo y pseudohifal
YGR161C	<i>RTS3</i>	2,23	Componente del complejo proteín fosfatasa tipo 2A (PP2A)
YOR220W	<i>RCN2</i>	2,11	Proteína involucrada en la ruta de la calcineurina
YOL016C	<i>CMK2</i>	1,88	Quinasa dependiente de calmodulina
YJL108C	<i>PRM10</i>	1,74	Proteína regulada por feromonas
YIL117C	<i>PRM5</i>	1,73	Proteína regulada por feromonas
YLR178C	<i>TFS1</i>	1,72	Proteína que interacciona e inhibe la carboxipeptidasa Y e Ira2
Metabolismo lipídico/tráfico vesicular			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YBR147W	<i>RTC2</i>	2,28	Transportador de aminoácidos catiónicos de la membrana vacuolar. Contribuye a la homeostasis.
YJL153C	<i>INO1</i>	2,21	Inositol 3-fosfato sintasa involucrada en la síntesis de fosfolípidos
YGR110W	<i>CLD1</i>	1,89	Fosfolipasa mitocondrial cuya expresión incrementa en respuesta a estrés genotóxico
YBL078C	<i>ATG8</i>	1,81	Componente de autofagosomas.
YHR209W	<i>CRG1</i>	1,78	Involucrada en la homeostasis lipídica
YPL057C	<i>SUR1</i>	1,72	Implicada en la biosíntesis de esfingolípidos
YPL095C	<i>EEB1</i>	1,72	Responsable de la síntesis de ácidos grasos de cadena media
Otras funciones			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YPL250C	<i>ICY2</i>	2,74	Proteína de función desconocida que se moviliza a los polisomas cuando la célula cambia de condiciones fermentables a no fermentables. Es un sustrato potencial de Cdc28
YGL255W	<i>ZRT1</i>	2,44	Transportador de la membrana plasmática con alta afinidad por Zinc
YLR136C	<i>TIS11</i>	2,12	Proteína de unión al RNAm involucrada en la homeostasis de hierro
YKR039W	<i>GAP1</i>	2,01	Permeasa de ácidos grasos
YDL204W	<i>RTN2</i>	1,98	Proteína del retículo endoplasmático que estabiliza la curvatura de la membrana
YGR121C	<i>MEP1</i>	1,96	Transportador de amonio

YPL088W		1,96	Aril alcohol deshidrogenasa
YOR273C	<i>TPO4</i>	1,93	Proteína transportadora de poliamina
YHR087W	<i>RTC3</i>	1,9	Relacionada con el metabolismo de RNA
YOR382W	<i>FIT2</i>	1,87	Manoproteína de la pared celular involucrada en la retención en pared de sideroforo-hierro
YBL111C	<i>YRF1-1</i>	1,83	Helicasa codificada por la región de los telómeros, altamente expresada en mutantes que pierden la región de los telómeros TLC1; potencialmente fosforilada por Cdc28.
YER067W	<i>RGI1</i>	1,78	Proteína de función desconocida involucrada en el metabolismo energético bajo condiciones respiratorias
YEL071W	<i>DLD3</i>	1,75	D-lactato deshidrogenasa inducida por daño mitocondrial
YCL010C	<i>SGF29</i>	1,75	Componente del complejo SAGA implicado en la transcripción
YLL038C	<i>ENT4</i>	1,74	Proteína de función desconocida propuesta para el tráfico de Arn1 en la falta de ferricromo
YBL100W-A		1,70	Retrotransposon
Función desconocida			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YBR056W-A	<i>BOP2</i>	4,15	
YHR022C		3,88	
YLR267W		3,65	
YGL117W		2,74	
YJL133C-A		2,09	
YLR412C-A		1,88	

Tabla 10: Clasificación funcional de los genes diferencialmente reprimidos más de 0,6 veces en presencia de neomicina con respecto al control. La agrupación en categorías funcionales se realizó de acuerdo a la herramienta bioinformática *Go Term Finder*. Los ratios corresponden al valor medio de represión obtenidos en tres réplicas biológicas y todos los valores son estadísticamente significativos según la prueba *t-student* ($p \leq 0,05$), aplicada para el análisis de datos.

Apareamiento			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YBR040W	<i>FIG1</i>	0,14	proteína integral de la membrana requerida para el apareamiento
YIL037C	<i>PRM2</i>	0,24	Proteína de membrana regulada por feromonas (Ste12) y requerida para la fusión nuclear
YNL279W	<i>PRM1</i>	0,34	Proteína de membrana regulada por feromonas (Ste12) involucrada en la fusión de membranas durante el apareamiento.
YNR044W	<i>AGA1</i>	0,37	Proteína altamente O-glicosilada y con señal de adición de GPI para anclarse a la pared celular
YPL192C	<i>PRM3</i>	0,39	Proteína regulada por feromonas e implicada en la fusión de la envoltura nuclear
YJL170C	<i>ASG7</i>	0,45	Regula la señal de Ste4, la subunidad β de proteína G
YCR089W	<i>FIG2</i>	0,57	Proteína de la pared celular expresada durante el apareamiento. Puede estar implicada en el mantenimiento de la pared durante el apareamiento celular.
YGL032C	<i>AGA2</i>	0,52	Su secuencia C-terminal actúa como un ligando para alfa-aglutinina (Sag1) durante la aglutinación

Biosíntesis de la pared celular			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YBR067C	<i>TIP1</i>	0,51	Manoproteína de la pared celular con posible actividad lipasa
YLR307W	<i>CDA1</i>	0,54	Quitina desacetilasa implicada en la síntesis de componentes de la pared de las ascosporas
Procesos metabólicos			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YJR078W	<i>BNA2</i>	0,41	Triptófano 2,3 - dioxigenasa o indolamina 2,3 - dioxigenasa, necesaria para la biosíntesis <i>de novo</i> de NAD a partir de triptófano. Regulada por Hst1 (desacetilasa de histonas dependiente de NAD+, parálogo de Sir2)
YCL064C	<i>CHA1</i>	0,54	L-treonina, L-serina desaminasa implicada en la degradación de treonina y serina para utilizarlas como única fuente de nitrógeno
YBL098W	<i>BNA4</i>	0,59	Quinurenina 3 mono oxigenasa, necesaria para la biosíntesis <i>de novo</i> de NAD a partir de triptófano. Regulada por Hst1 (desacetilasa de histonas dependiente de NAD+, parálogo de Sir2)
Transposición			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YIL082W-A	---	0,49	
YGR109W-B	---	0,56	
Transporte a través de membrana			
ORF	Gen	Ratio neo/control	Descripción
YML047C	<i>PRM6</i>	0,15	Proteína regulada por feromonas (Ste12) durante el apareamiento
YHR015W	<i>MIP6</i>	0,44	Proteína de unión a ARN, interactúa con Mex67p, un componente del poro nuclear implicado en la exportación nuclear de ARNm
Respiración celular			
ORF	Gen	Ratio neo/Control	Descripción
YJL045W	---	0,59	
Homeostasis iónica			
ORF	gen	neo/control	Descripción
YOL101C	<i>IZH4</i>	0,52	Proteína de membrana implicada en la homeostasis de iones de zinc y con posible papel en el metabolismo de esteroides
Maduración endosomal			
ORF	gen	neo/control	Descripción
YNL086W	<i>SNN1</i>	0,56	Proteína de función desconocida, miembro probable del complejo BLOC involucrado en clasificación endosomal de carga
Crecimiento pseudohifal			
ORF	gen	neo/control	Descripción
YJR153W	<i>PGU1</i>	0,58	Endo-poligalacturonasa, enzima pectolítica que hidroliza los enlaces alfa- 1,4 - glucosídico en las cadenas ramnagalacturonano en pectinas

Estos genes se muestran agrupados en categorías funcionales en la Figura 64 mediante la herramienta bioinformática *Go Slim Mapper* (<http://www.yeastgenome.org>, Stanford University, CA). Según estas categorías los genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos y síntesis proteica están inducidos significativamente, teniendo en cuenta el número total de genes relacionado con estos procesos de forma global en el genoma ($p\text{-value}<0,01$). Además se encuentran diferencialmente expresados en esta condición genes relacionados con la respuesta a estrés, señalización y biosíntesis de la pared, así como genes implicados en el metabolismo lipídico. En cuanto a los genes reprimidos, la mayoría están relacionados con apareamiento, procesos metabólicos y biogénesis y organización de la pared celular.

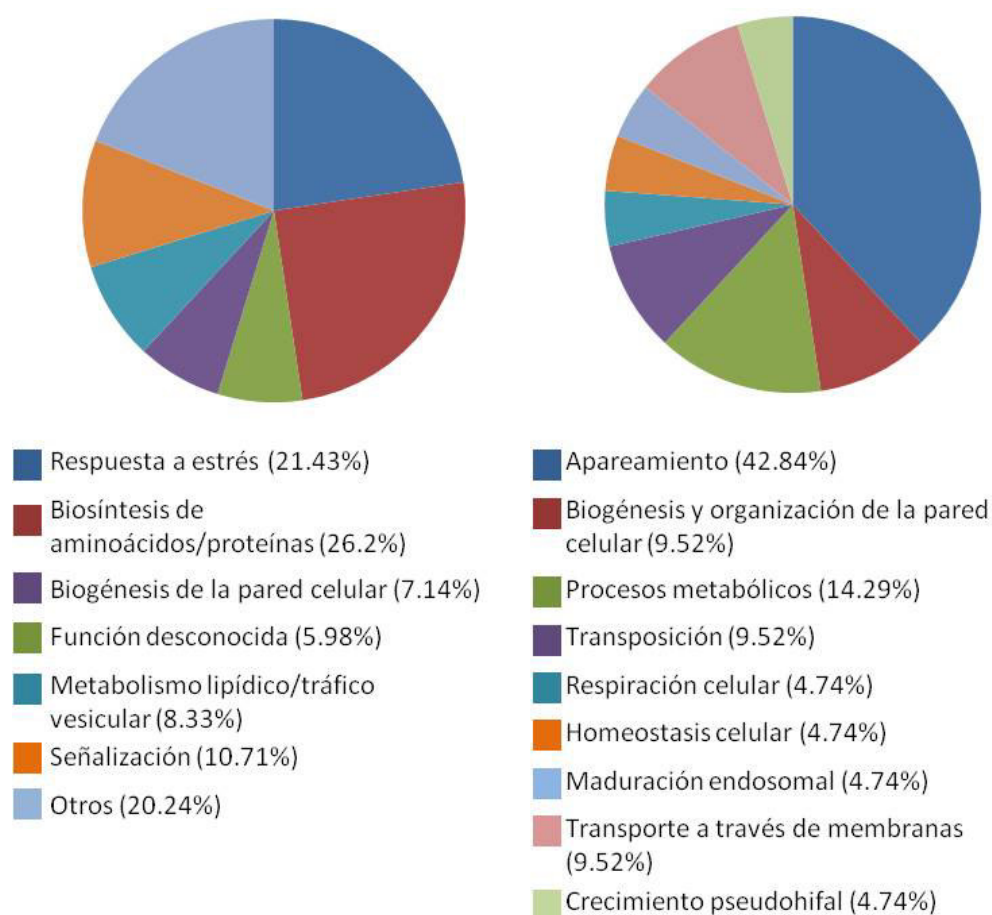


Figura 64: Análisis transcriptómicos de la respuesta a neomicina. Gráficos obtenidos con la herramienta bioinformática *Go Slim Mapper* de la base de datos *SGD* (<http://www.yeastgenome.org>) representando los porcentajes de genes inducidos por encima de 1,7 veces en la cepa en presencia de neomicina en comparación con la control (panel izquierdo) o reprimidos por debajo de 0,6 en las condiciones anteriores (panel derecho).

Para verificar la validez de los datos del perfil transcripcional obtenido con neomicina realizamos una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) con genes representativos de las principales categorías funcionales (Figura 64). De los genes inducidos relacionados con la biosíntesis de aminoácidos seleccionamos *STR3* y *ARG1*, que codifican proteínas implicadas en dos rutas metabólicas distintas, la síntesis de aminoácidos sulfurados y la de arginina. También escogimos genes relacionados con la respuesta a estrés (*HSP12*), biosíntesis de la pared celular (*PIR3*), señalización (*BAG7*) y metabolismo lipídico (*INO1*). Los resultados obtenidos confirmaron que existía una inducción de todos estos genes en presencia de neomicina, obteniéndose en la mayoría de los casos ratios similares a los obtenidos con los *microarrays* de DNA, lo cual valida los resultados transcriptómicos obtenidos (Figura 65).

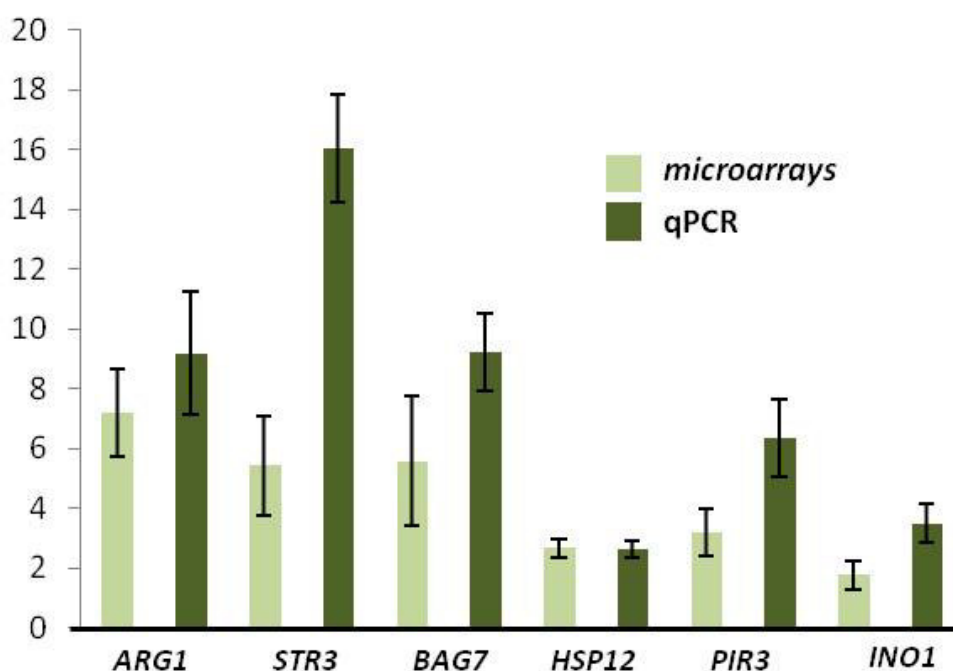


Figura 65: Comparación de la inducción transcripcional mediante qRT-PCR y *microarrays* de DNA en condiciones de activación con neomicina. En la gráfica se muestra en verde oscuro los niveles de inducción de 6 genes escogidos para confirmar mediante RT-PCR, empleando como control interno *ACT1*, y en verde claro los valores que se obtuvieron inicialmente en los experimentos de *microarrays*. Los datos son la media y la desviación estándar de 3 experimentos.

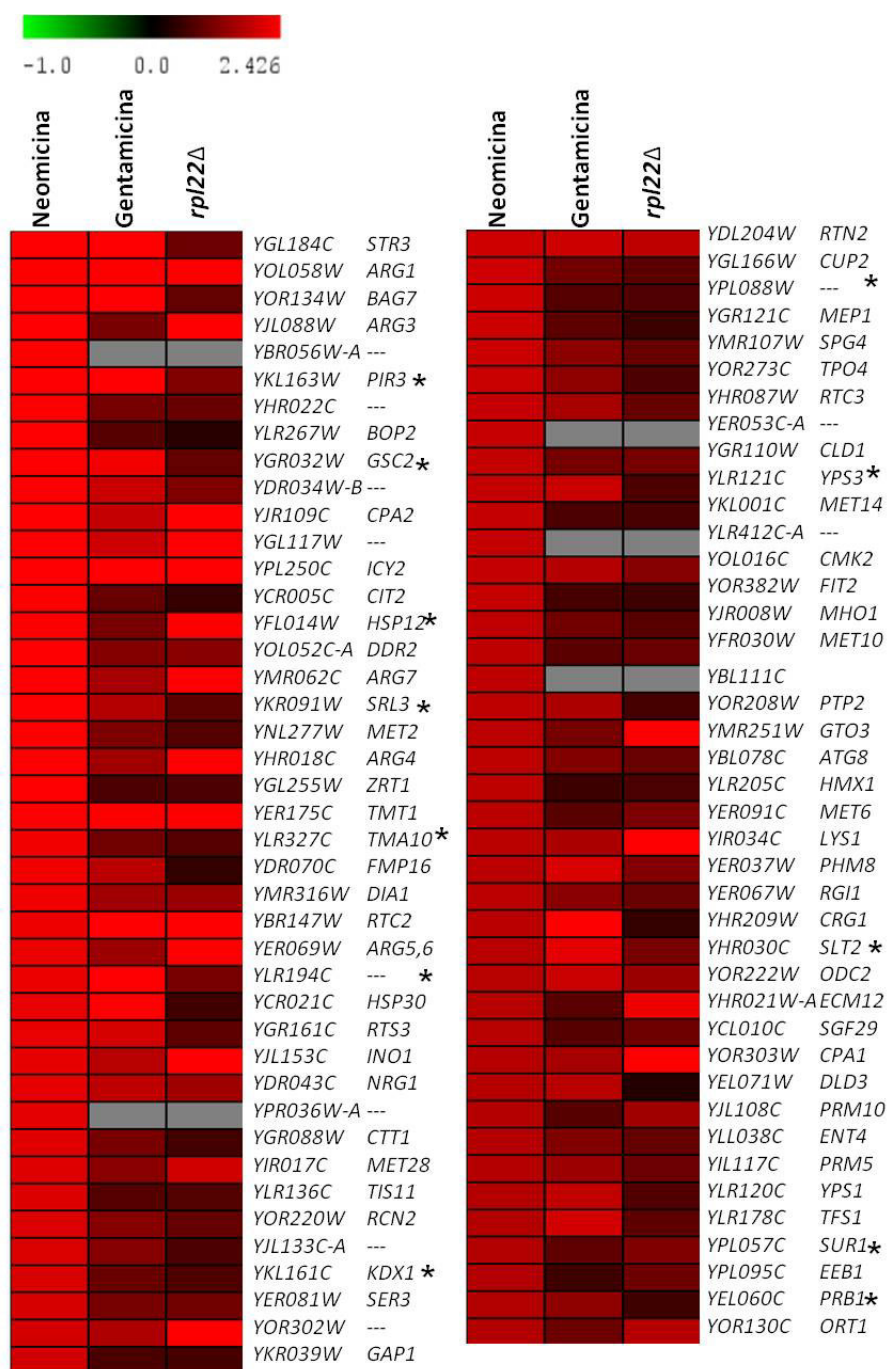


Figura 66: Perfil de expresión de los genes que se inducen en presencia de neomicina y comparación con las respuestas transcripcionales a gentamicina y del mutante *rpl22Δ*. Agrupamiento en columnas de los diferentes genes expresados tras el tratamiento con neomicina en comparación con gentamicina (base de datos GEO) y el mutante ribosomal *rpl22* (Komili *et al.*, 2007). Cada fila representa el ratio de expresión para un gen en concreto en las diferentes condiciones indicadas en la parte superior de las columnas; cuando este valor se encuentra por encima de 1 el color es rojo y cuando está por debajo, verde; la saturación hacia rojo o hacia verde está indicada en la barra superior y depende de la magnitud del valor del ratio. Las casillas en gris indican que falta el valor para ese gen en esa condición. Para el análisis comparativo se utilizó el software MarQ (MarQ.cnb.csic.es) y para el *clustering* la versión 4.9 del software MultiExperiment Viewer (MeV). En la imagen aparecen marcados con un asterisco aquellos genes que también presentan una mayor expresión transcripcional en respuesta general a estrés de la ruta CWI como en presencia de rojo Congo o zimoliasa y la observada en mutantes carentes de proteínas necesarias para la síntesis de la pared celular como *fks1Δ*, *gas1Δ*, *knr4Δ*, *kre6Δ* y *mnn9Δ* (García *et al.*, 2004).

Mediante la herramienta bioinformática *MarQ* [(MarQ.cnb.csic.es, (Vázquez *et al.*, 2010)] analizamos la base de datos GEO y comprobamos que el grupo de genes más expresados en presencia de neomicina se encuentra también inducido en presencia de gentamicina ($p\text{-value} < 0,0001$), otro aminoglucósido y en un mutante deficiente en la proteína ribosomal Rpl22 (Komili *et al.*, 2007) ($p\text{-value} < 0,0001$). Con la versión 4.9 del *software* MeV MultiExperiment Viewer representamos en la Figura 66 la comparación de los perfiles transcripcionales de inducción de la expresión génica observados en respuesta a estas tres condiciones. Además se indican los genes cuya inducción tiene también lugar en la respuesta común a estrés sobre la pared celular considerada en el trabajo de García *et al.* (2004), en el que se compara la respuesta transcripcional frente a rojo Congo y zimoliasa, junto con la observada en mutantes carentes de proteínas necesarias para la síntesis de la pared celular como *fks1Δ*, *gas1Δ*, *knr4Δ*, *kre6Δ* y *mnn9Δ* (Lagorce *et al.*, 2003).

La herramienta bioinformática *Genecodis* reveló que los principales factores de transcripción implicados en la regulación de los genes diferencialmente inducidos en presencia de neomicina son Gcn4 y Sok2, con un $p\text{-value} = 10^{-13}$. Gcn4 regula la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, se activa en situaciones de ayuno y responde a estrés ambiental y daños en DNA por agentes alquilantes. Y Sok2 que se localiza en el citosol en condiciones de hipoxia, está implicado en la vía de señalización de PKA de manera dependiente de AMPc y en la regulación negativa de la diferenciación pseudohifal. Además también parecen estar implicado en la respuesta a neomicina el factor de transcripción Rlm1, de la ruta CWI; Msn2 y Msn4, activados en respuesta a estrés general e implicados en la respuesta a estrés osmótico dependiente de la ruta HOG; Sko1, represor transcripcional también responsable de la respuesta a estrés osmótico y oxidativo mediada por Hog1; y Swi4, también activado por la ruta CWI ($p\text{-value} = 9.6844^{-11}$, 3.4495^{-09} , 1.6276^{-06} , 2.4549^{-06} y 0.00028947 , respectivamente) (Tabla 11).

En resumen, el estudio transcriptómico indica que el tratamiento con neomicina desencadena una respuesta transcripcional relacionada con la inhibición de la síntesis proteica y, en menor medida, con una respuesta general a estrés, incluido el estrés osmótico y de pared celular.

Tabla 11. Factores de transcripción relacionados con la regulación de determinados genes que fueron diferencialmente expresados en los *microarrays* en presencia de neomicina (% Neo). Para el análisis se empleó el *software* Yeasttract (www.yeasttract.com). La relación entre los factores de transcripción y los genes que regulan en el genoma esta documentada según las bases de datos (% total).

Factor de transcripción	% Neo	% total	p-value	genes regulados
Gcn4p : regula la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos. Se activa en situaciones de ayuno. También responde a estrés ambiental y daños en DNA por agentes alquilantes.	93.02%	1.34%	1.14^{-13}	YBR056W-A, RTC2, CIT2, HSP30, YDR034W-B, NRG1, FMP16, ARG5, SER3, TMT1, HSP12, YGL117W, STR3, ZRT1, CTT1, RTS3, ARG4, YHR022C, MET28, ARG3, INO1, CPA2, MLP1, PIR3, GAP1, SRL3, TIS11, YLR194C, BOP2, TMA10, ARG7, DIA1, MET2, DDR2, ARG1, BAG7, RCN2, YOR302W, ICY2
Sok2p : regula negativamente la diferenciación pseudohifal, regula la vía de señalización de PKA de manera dependiente de AMPc y localiza en el citosol en condiciones de hipoxia.	83.72%	1.60%	2.07^{-13}	YBR056W-A, RTC2, CIT2, HSP30, YDR034W-B, NRG1, FMP16, ARG5, SER3, TMT1, HSP12, ZRT1, GSC2, CTT1, RTS3, ARG4, YHR022C, MET28, ARG3, INO1, CPA2, PIR3, GAP1, SRL3, YLR194C, BOP2, TMA10, ARG7, DIA1, MET2, DDR2, ARG1, BAG7, RCN2, ICY2, YPR036W-A
Rlm1p : involucrado en el mantenimiento de la integridad celular, fosforilado y activado por la MAPK Slt2.	46.51%	2.81%	9.68^{-11}	RTC2, YDR034W-B, FMP16, HSP12, YGL117W, ZRT1, GSC2, CTT1, RTS3, MET28, MLP1, PIR3, SRL3, YLR194C, BOP2, TMA10, ARG7, DDR2, ARG1, BAG7
Msn2p : se activa en respuesta a estrés general.	88.37%	1.11%	3.45^{-09}	RTC2, CIT2, HSP30, YDR034C-A, YDR034W-B, NRG1, FMP16, SER3, TMT1, HSP12, YGL117W, ZRT1, GSC2, CTT1, RTS3, ARG4, YHR022C, MET28, ARG3, YJL133C-A, INO1, CPA2, MLP1, PIR3, GAP1, SRL3, TIS11, YLR194C, BOP2, TMA10, DIA1, MET2, DDR2, ARG1, BAG7, RCN2, YOR302W, ICY2
Msn4p : se activa en respuesta a estrés general.	69.77%	1.17%	1.63^{-06}	RTC2, CIT2, HSP30, YDR034W-B, NRG1, FMP16, ARG5, HSP12, STR3, ZRT1, GSC2, CTT1, YHR022C, ARG3, INO1, CPA2, MLP1, PIR3, GAP1, SRL3, TIS11, YLR194C, BOP2, TMA10, DIA1, DDR2, ARG1, BAG7, RCN2, ICY2
Sko1p : regula la respuesta a estrés osmótico y oxidativo.	39.53%	1.84%	2.45^{-06}	HSP30, NRG1, ARG5, HSP12, STR3, CTT1, RTS3, ARG4, YHR022C, ARG3, MLP1, PIR3, GAP1, TMA10, DDR2, ARG1, ICY2
Swi4p : componente del complejo SBF activado por Slt2p. Regula ciclina y genes requeridos para síntesis y reparación de DNA	34.88%	1.41%	2.89^{-04}	HSP30, ARG5, TMT1, HSP12, STR3, ZRT1, GSC2, PIR3, YLR194C, TMA10, ARG7, DDR2, ARG1, YOR302W, ICY2

2.5. Identificación de nuevos componentes moduladores de la ruta de Integridad Celular

2.5.1. Análisis de interacciones genéticas con el IPAC para identificar genes relacionados con la ruta CWI

En un trabajo previo llevado a cabo por nuestro grupo, se obtuvo un E-MAP (*Epistatic Microarray Profile*) combinando la cepa que contiene integrado el IPAC con una subcolección de mutantes delecionados en genes no esenciales (Martín *et al.*, 2015), con el fin de estudiar el potencial del IPAC para identificar nuevos componentes moduladores o procesos relacionados con la ruta CWI. Aquellos mutantes capaces de crecer en presencia de zimoliasa, por cortar la hiperactivación provocada por el IPAC, debían estar participando en la transmisión de la señal a través de la ruta CWI. Los genes identificados en este ensayo aparecen recogidos en la Tabla 12. De entre estos genes, *SLT2*, *RLM1*, *STE50*, *HOG1* y *OPY2*, ya estaban descritos que participan en la respuesta a zimoliasa (Bermejo *et al.*, 2008).

Tabla 12. Lista de genes cuyos deleción provoca resistencia a zimoliasa en ensayo de interacciones genéticas con IPAC. Se enfrentó una colección de mutantes sencillos no esenciales con una cepa que portaba integrado el IPAC (YSTH2) y se obtuvieron los genes aquí indicados como resistentes a zimoliasa 100T (150µg/ml).

Genes				
<i>SLT2</i>	<i>RLM1</i>	<i>STE50</i>	<i>HOG1</i>	<i>OPY2</i>
<i>MNN11</i>	<i>BUD27</i>	<i>PFK26</i>	<i>UME6</i>	<i>FLX1</i>
<i>MOG1</i>	<i>SSF1</i>	<i>SIC1</i>		

Para confirmar la participación de los otros genes, analizamos la sensibilidad a estímulos de la ruta CWI de los correspondientes mutantes transformados con el plásmido centromérico que contenía el IPAC o el vector vacío. Para ello realizamos diluciones decimales seriadas en placas que contenían rojo Congo, zimoliasa o SDS y comparamos el comportamiento de estos mutantes con la cepa silvestre y con el mutante *rlm1Δ*, que es capaz de eliminar la letalidad del circuito. Como se observa en la Figura 67, los mutantes *mnn11Δ*, *mog1Δ* y *ssf1Δ* presentan un comportamiento muy similar al observado en la cepa silvestre mientras que los mutantes *pfk26Δ* y *flx1Δ* en presencia del IPAC muestran cierta resistencia a estos tratamientos. En relación a los otros mutantes, tanto *bud27Δ* como *ume6Δ* y *sic1Δ* presentan sensibilidad a las concentraciones

utilizadas de rojo Congo, zimoliasa y SDS incluso en ausencia del circuito. En la Tabla 13 están recogidos todos los mutantes analizados y los resultados obtenidos.

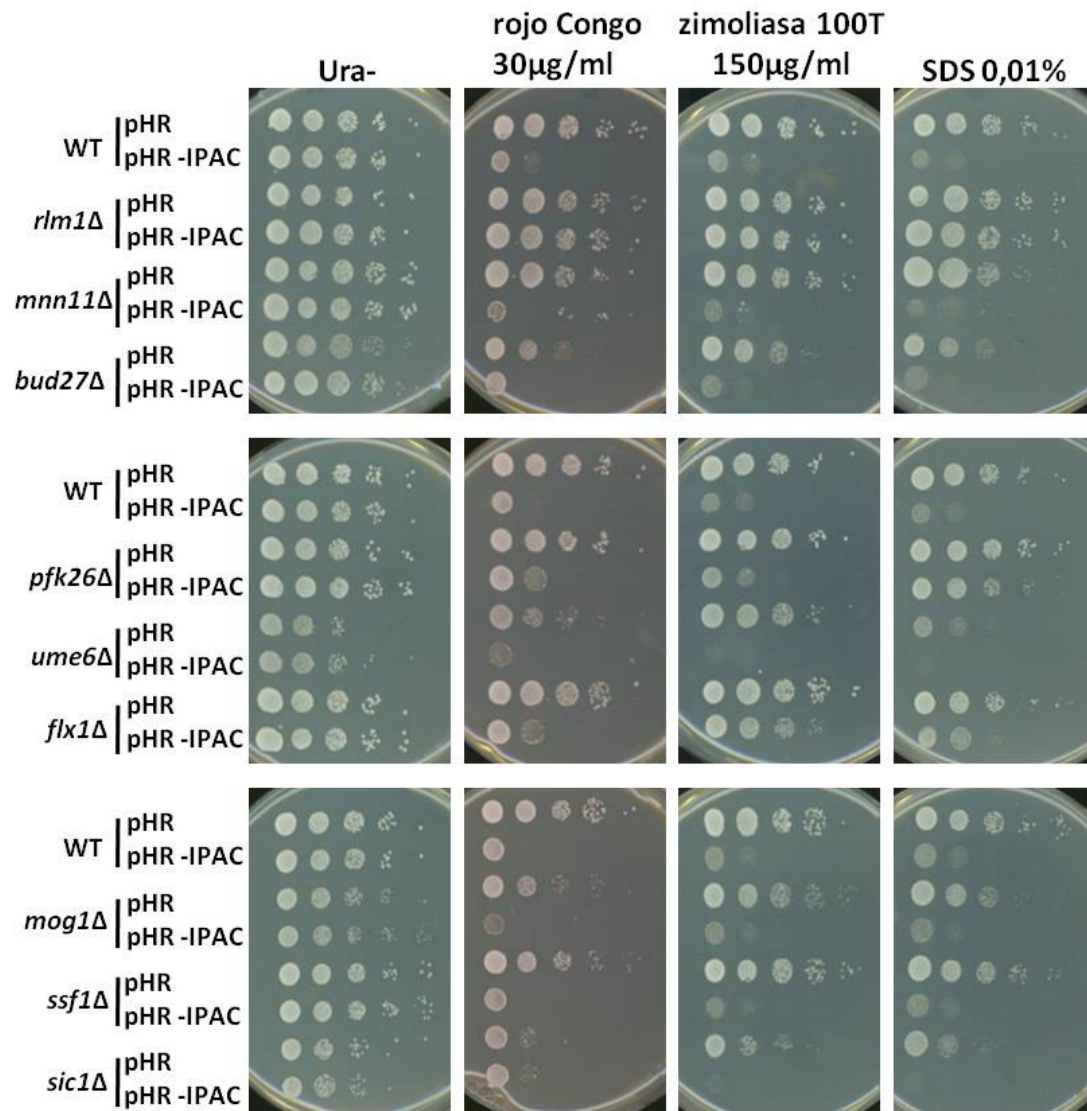


Figura 67. Estudio de sensibilidad en medio sólido de distintos mutantes a estímulos de la ruta CWI. Ensayo de crecimiento en gotas de diluciones decimales seriadas de distintas cepas transformadas con el vector vacío (pHR70) o el plásmido que lleva el IPAC (pHR70-IPAC) en presencia de rojo Congo (30µg/ml), zimoliasa (150µg/ml) o SDS (0,01%).

Tabla 13. Genes cuya delección provoca resistencia a rojo Congo, zimoliasa o SDS en células que portan el IPAC. Esta tabla recoge los resultados obtenidos en el ensayo de crecimiento en gotas de diluciones seriadas de los distintos mutantes mostrados en la Figura 65. Con + se indica las gotas que recupera el crecimiento de ese mutante con el IPAC, en relación a la cepa silvestre y el asterisco indica que no se pudo valorar la recuperación del crecimiento ya que esos mutantes no crecieron en ausencia del IPAC. El No indica que el crecimiento en estos mutantes es similar a la cepa silvestre.

Gen	Función	Recuperación del crecimiento en presencia de		
		RC	Zym	SDS
<i>RLM1</i>	Factor de transcripción de la ruta CWI	+++	+++	+++
<i>PFK26</i>	6-fosfofructo-2-quinasa. Enzima de la glucólisis inhibida por fosfoenolpiruvato y glicerol 3-fosfato. Regulada transcripcionalmente por la proteína quinasa A.	+	+	+++
<i>FLX1</i>	Proteína requerida para el transporte de flavín adenín dinucleótido (FAD) necesario para la síntesis de riboflavina de la membrana mitocondrial.	+	+++	++
<i>BUD27</i>	Proteína involucrada en el inicio de la traducción. El mutante muestra una expresión inapropiada de genes sensibles a nutrientes debido a un fallo en la desrepresión del factor de transcripción Gcn4.	*	*	*
<i>UME6</i>	Subunidad del complejo Rpd3 desacetilasa de histonas y regulador transcripcional de genes tempranos de la meiosis. Acopla la respuesta metabólica nutricional con la iniciación y progresión de la meiosis formando complejos con Ime1.	*	*	*
<i>SIC1</i>	Inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas (CKI). Inhibidor del complejo Cdc28-Clb quinasa que controla la transición de la fase G1/S, impide la entrada prematura en la fase S y garantiza la integridad genómica.	*	*	*
<i>MNN11</i>	Subunidad del complejo manosiltransferasa del aparato de Golgi junto con Anp1, Mnn9, Mnn10 y Hoc1. Su homólogo es Mnn10.	No	No	No
<i>MOG1</i>	Proteína nuclear que interacciona con GTP-Gsp1 homóloga de la familia Ras GTPasa. Estimula la liberación de nucleótidos necesarios para las proteínas nucleares. La liberación de nucleótidos es inhibida por Yrb1.	No	No	No
<i>SSF1</i>	Subunidad del complejo FACT (Spt16-Pob3) que se asocia con la cromatina y reorganiza los nucleosomas para facilitar el acceso del RNA y la DNA polimerasa al DNA. Algunas mutaciones causan una alta transcripción de regiones del genoma.	No	No	No

Por último, estudiamos la inducción transcripcional de la ruta CWI en los mutantes que recuperaron el crecimiento o fueron dudosos en el ensayo anterior, en ausencia del circuito de amplificación IPAC y en presencia de zimoliasa, rojo Congo y SDS para determinar cuáles de ellos presentaban alteraciones en la activación de la ruta CWI (Figura 68). Así observamos cómo todos

estos mutantes presentan una reducción de la inducción transcripcional de *MLP1* en presencia de rojo Congo y zimoliasa, mientras que en presencia de SDS, solo ocurre en *pfk26Δ*, *bud27Δ*, *rlm1Δ* y *sic1Δ*. Hay que destacar también que los mutantes *bud27Δ*, *sic1Δ* y *ume6Δ*, presentan una activación basal mayor que en la cepa silvestre, lo que concuerda con los datos obtenidos en los crecimientos en gotas de diluciones decimales seriadas donde estos mutantes, en ausencia del circuito IPAC, presentaban problemas de crecimiento en presencia de estrés de la ruta CWI.

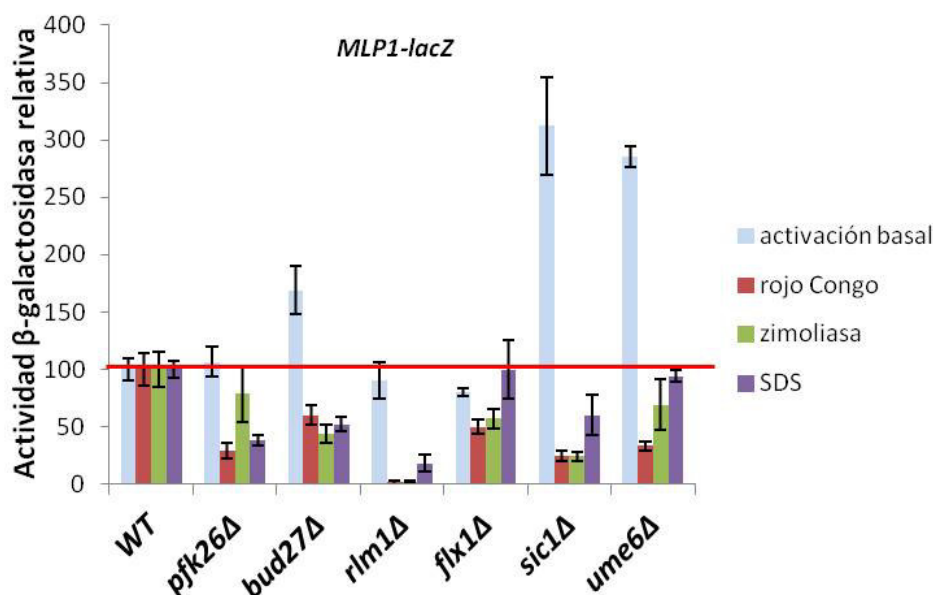


Figura 68. Activación transcripcional de la ruta CWI en respuesta a rojo Congo, zimoliasa o SDS en los mutantes *pfk26Δ*, *bud27Δ*, *rlm1Δ*, *flx1Δ*, *sic1Δ* y *ume6Δ*. Estudio de la inducción transcripcional de los mutantes de delección pertenecientes a la colección *Euroscarf* que mostraron resistencia a estímulos de la ruta, mediante el análisis de actividad β-galactosidasa. Todos estos mutantes fueron transformados con el plásmido YEp352-*pMLP1-lacZ* y tratados durante 4 horas con 30μg/ml de rojo Congo, 0,8 unidades/ml de zimoliasa o SDS al 0,01%. Se representa la media y la desviación estándar del análisis de tres transformantes relativos al valor de 100% asignado a la cepa silvestre sin estímulo, con rojo Congo, zimoliasa o SDS en cada caso. Las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas con un $p\text{-value} \leq 0.05$ en el caso de *bud27Δ* y *sic1Δ*, *rlm1Δ* y *flx1Δ* con todos los estímulos, *pfk26Δ* con rojo Congo y SDS y *ume6Δ* en condiciones basales y con rojo Congo.

2.5.2. Uso del circuito IPAC en la identificación de genes relacionados con la ruta CWI en una sub-colección de mutantes de señalización y apoptosis

Por otro lado realizamos un nuevo rastreo de activación del circuito IPAC sobre una subcolección de 263 mutantes no esenciales, afectados en procesos de señalización y apoptosis (Tabla 6). Estos mutantes fueron transformados con el plásmido centromérico YCplac111-IPAC en placas de 96 pocillos con una eficiencia de transformación del 98%. Las células transformadas fueron cultivadas en medio sólido en presencia de zimoliasa, rojo Congo y SDS (Figura 69). Este

ensayo se realizó por duplicado y en la Tabla 14 aparecen los 39 mutantes que en ambos rastreos muestran resistencia a alguna de las condiciones estudiadas en presencia del circuito de amplificación de la señal de la ruta CWI.

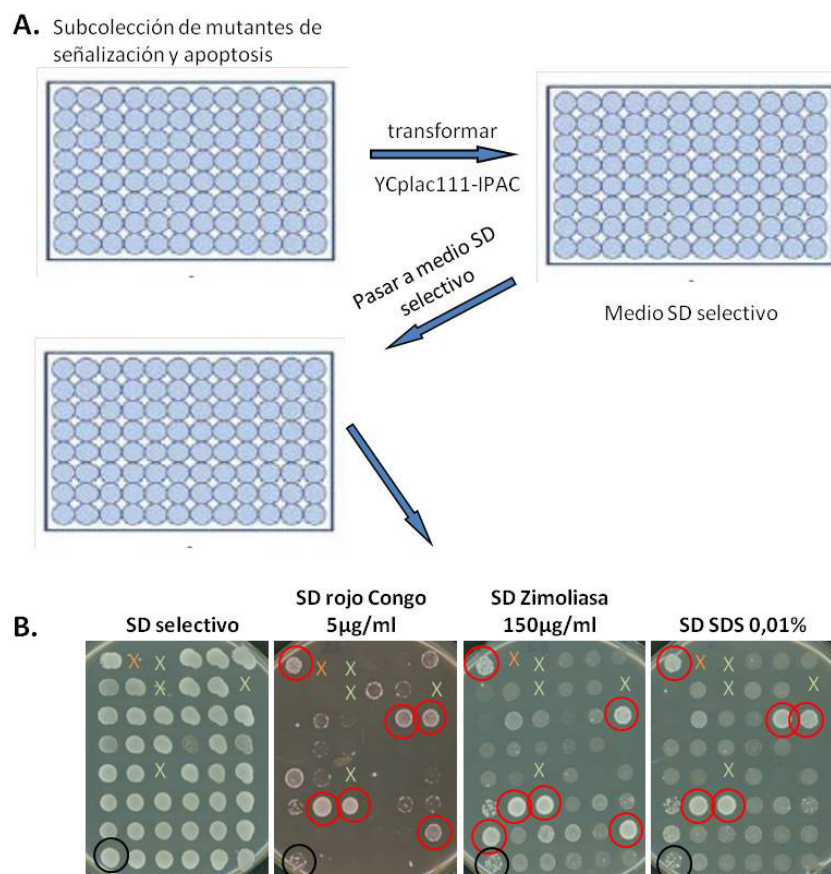


Figura 69. Diagrama que muestra las sucesivas etapas realizadas en la búsqueda de genes que suprimen la sensibilidad provocada por la hiperactividad de la ruta CWI. **A.** Rastreo de colección de mutantes haploides en genes no esenciales de señalización y apoptosis de *S. cerevisiae* (*Euroscarf*) para la búsqueda de moduladores de la ruta de integridad celular. Las cepas mutantes carentes de cada uno de los genes fueron transformadas con el plásmido YCplac111-IPAC e incubadas en medio selectivo a 30°C durante 72 horas hasta la aparición de un sedimento en el pocillo de la placa. La eficiencia de transformación obtenida en el rastreo primario fue del 98%. El sedimento se resuspendió y se transfirieron 5µl a una nueva placa multipocillo con 200µl medio selectivo. A continuación se introdujo el replicador en la placa que contenía los transformantes y se sembraron gotas en medio sólido selectivo con distintos estímulos de la ruta (1, 5 y 10µg/ml de rojo Congo, 150 y 200µg/ml de zimoliasa 100T y 0,01% de SDS). Las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C. Tras la incubación se identificó visualmente en qué mutantes se producía un efecto de supresión del fenotipo, en comparación con la cepa silvestre también transformada con el circuito de amplificación de YCplac111-IPAC. Este ensayo se realizó por duplicado. **B.** Ejemplo de placa representativa del rastreo. Los círculos negros representan la cepa silvestre BY4741, las X en naranja representan aquellos pocillos que no contienen levaduras en las placas originales de la colección, las X verdes aquellos pocillos donde no aparecieron transformantes y los círculos rojos marcan aquellos mutantes que recuperan el crecimiento en presencia de estímulos.

Tabla 14. Genes cuya delección provoca resistencia a rojo Congo, zimoliasa o SDS en células que portan el circuito IPAC. Tabla que recoge los resultados obtenidos del rastreo de genes cuya mutación elimina la sensibilidad provocada por la hiperactivación del circuito (Figura 69). Las X representan la condición frente a la cual los mutantes con el circuito recuperan el crecimiento en relación con la cepa control. En verde aparecen aquellos que posteriormente fueron analizados en diluciones decimales seriadas.

Gen	Recuperación del crecimiento en presencia de			Gen	Recuperación del crecimiento en presencia de		
	RC	Zym	SDS		RC	Zym	SDS
<i>SLT2</i>			X	<i>SNT1</i>		X	X
<i>MID2</i>	X	X	X	<i>FYV10</i>	X	X	X
<i>ROM2</i>	X			<i>HOS2</i>	X	X	X
<i>BCK1</i>			X	<i>CSN12</i>	X	X	X
<i>RLM1</i>	X	X	X	<i>SCP160</i>	X	X	X
<i>HOG1</i>		X		<i>PSY2</i>	X	X	X
<i>RPI1</i>		X		<i>CMP2</i>	X	X	
<i>PBS2</i>		X		<i>SRV2</i>	X	X	X
<i>STE50</i>	X			<i>POG1</i>		X	X
<i>STE11</i>		X		<i>HKR1</i>		X	
<i>STE20</i>		X		<i>SYG1</i>			X
<i>SPA2</i>		X		<i>SNF1</i>	X	X	X
<i>SSK1</i>			X	<i>BEM2</i>		X	X
<i>SSK2</i>	X	X	X	<i>PEA2</i>		X	
<i>OPY2</i>		X		<i>PPH3</i>		X	
<i>SHO1</i>		X	X	<i>SAP190</i>		X	
<i>PSK2</i>	X		X	<i>RNY1</i>		X	
<i>AVO2</i>	X	X		<i>RTS1</i>			X
<i>TIP41</i>		X		<i>VPS34</i>		X	X
<i>TIM18</i>	X	X	X				

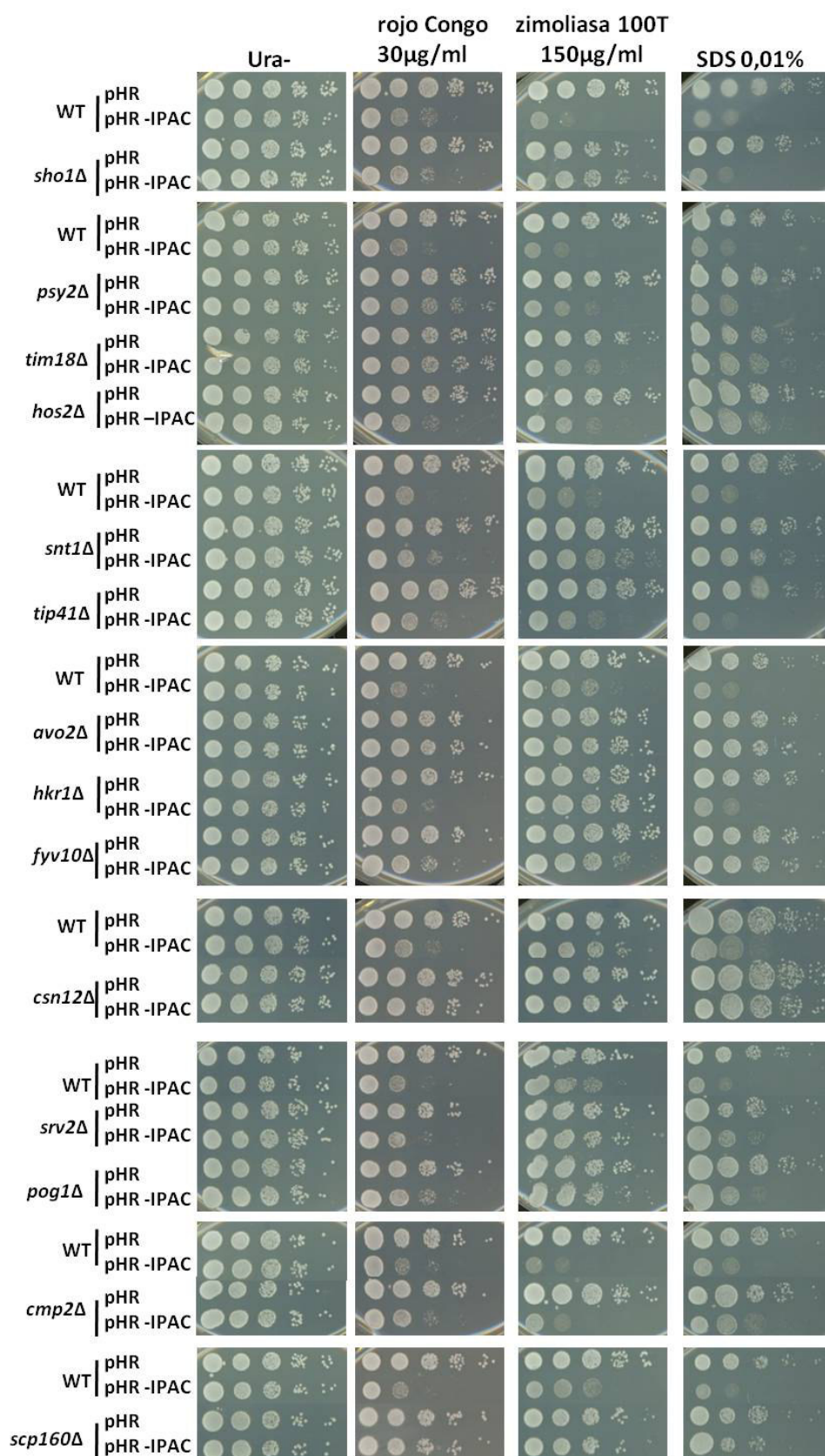


Figura 70: Estudio de sensibilidad a rojo Congo, zimoliasa o SDS de los mutantes de la subcolección de señalización y apoptosis que salieron positivos en los rastreos de disminución de sensibilidad. Ensayo de crecimiento en gotas de diluciones decimales seriadas en placas suplementadas con 10µg/ml de rojo Congo, 150µg/ml de zimoliasa o SDS al 0,01% de los mutante de la colección de *Euroscarf* indicados y transformados con el vector vacío o el plásmido pHR70-IPAC.

Tabla 15. Genes cuya delección provoca resistencia a rojo Congo, zimoliasa o SDS en presencia del IPAC en el ensayo de crecimiento en gotas de diluciones seriadas mostrado en la Figura 70. Las + representan las gotas que recupera cada mutante transformado con el plásmido pHR70-IPAC con respecto a la cepa silvestre (BY4741) transformada con el mismo plásmido.

Gen	Función	Recuperación del crecimiento en presencia de		
		RC	Zym	SDS
<i>AVO2</i>	Componente de un complejo formado por la quinasa Tor2 y otras proteínas. Puede tener un papel en la regulación del crecimiento celular.	+++	+++	++
<i>TIP41</i>	Proteína que interacciona con Tap42, la cual regula PP2A, componente de la ruta de señalización TOR. Esta proteína incrementa la replicación del DNA en respuesta a estrés.	+		
<i>TIM18</i>	Componente del complejo mitocondrial TIM22 implicado en la inserción de proteínas politópicas en la membrana interna. Puede mediar el ensamblaje y la estabilidad del complejo.	+++	+	++
<i>SNT1</i>	Subunidad del complejo desacetilasa Set3C que interacciona directamente con Sif2, proteína de unión al DNA. El mutante tiene mayor tolerancia a aneuploidias.	+	+++	++
<i>FYV10</i>	Subunidad del complejo GID implicado en la inactivación de enzimas de la gluconeogénesis (Fructosa-2,6-bisfosfatasa y fosfoenolpiruvato quinasa).	+	+	+++
<i>HOS2</i>	Desacetilasa de histonas del complejo Set3 y Rpd3L requerida para la activación de genes. Co-localiza en el núcleo con Cmr1 en respuesta a daño en el DNA.	+	+	+
<i>CSN12</i>	Proteína que forma un complejo con Thp3. Puede tener un papel en la elongación de la transcripción y/o en el <i>splicing</i> de RNAm.	++		++
<i>SCP160</i>	Proteína G de unión a RNA implicada en la ruta de respuesta a feromonas, principalmente asociada a la membrana nuclear o retículo endoplasmático ya que se asocia a los ribosomas por dominios KH participando en la traducción del RNAm.	+++	++	++
<i>PSY2</i>	Subunidad del complejo fosfatasa PP4. Participa en la recuperación frente a un daño en el DNA.	++	+	
<i>CMP2</i>	Calcineurina A; una isoforma de la subunidad catalítica de la calcineurina regulada por calcio. A su vez regular el factor de transcripción de respuesta a estrés: Crz1.		+	
<i>SRV2</i>	Subunidad del complejo adenil ciclasa. Por el extremo amino se une a la adenil ciclasa facilitando la activación de RAS y por el extremo carboxilo se une a los monómeros de actina regulando el citoesqueleto de actina y la morfogénesis.	+	++	
<i>POG1</i>	Proteína nuclear asociada a la cromatina de función desconocida.	++	++	+
<i>HKR1</i>	Sensor transmembrana de tipo mucina que transmite la señal a sho1p para así activar la ruta HOG.		+++	
<i>SHO1</i>	Osmosensor transmembrana implicado en la activación de Cdc42 y MAPK de la vía de crecimiento filamentoso y de respuesta a alta osmolaridad.		+++	

La confirmación de estos resultados se realizó mediante ensayos de crecimiento de diluciones decimales seriadas de células transformadas de nuevo con el IPAC portado en el vector pHR70 y utilizando las condiciones anteriores. En este análisis se excluyeron aquellos mutantes que ya estaban descritos como componentes de la ruta de integridad celular o de la ruta de respuesta a alta osmolaridad que participan en la respuesta mediada a través de la ruta CWI en presencia de zimoliasa, excepto *sho1Δ* que se utilizó como control. De este modo se analizaron los 24 mutantes de delección marcados en la Tabla 14 en verde. De ellos, solo 14 mutantes muestran pérdida de sensibilidad a alguna de estas condiciones de activación de la ruta CWI en presencia de IPAC (Figura 70, Tabla 15). Entre éstos hay que destacar *tim18Δ*, *snt1Δ*, *avo2Δ*, *fyv10Δ*, *csn12Δ*, *pog1Δ* y *scp160Δ* que recuperan el crecimiento en todas las condiciones estudiadas.

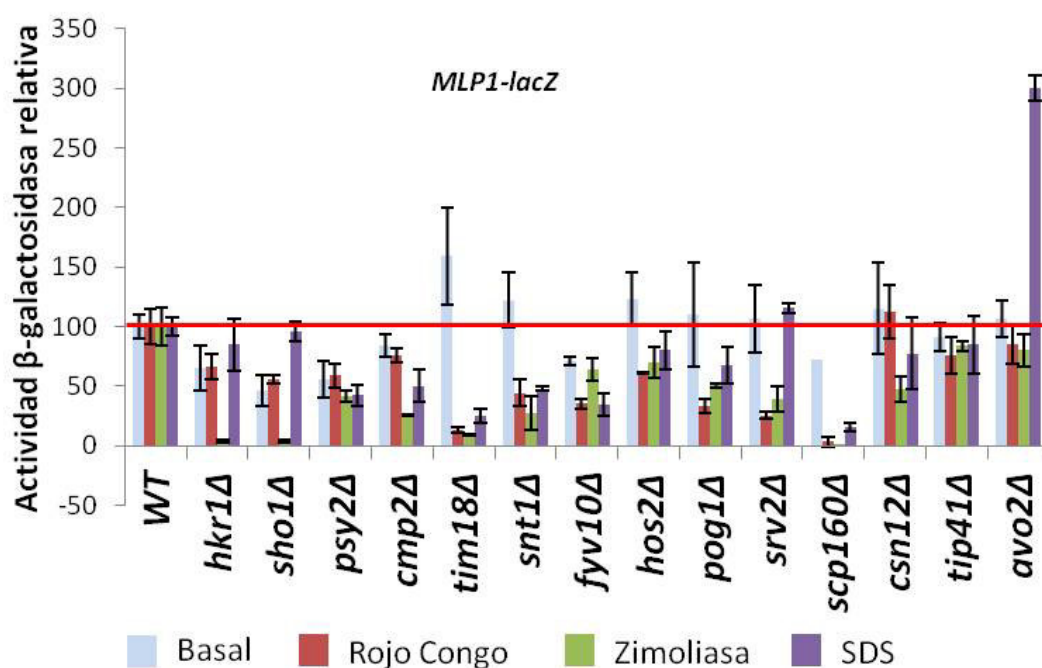


Figura 71. Activación transcripcional de la ruta CWI en respuesta a rojo Congo, zimoliasa o SDS en los mutantes indicados. Estudio de la inducción transcripcional de los mutantes resistentes a estímulos de la ruta, mediante el análisis de actividad β -galactosidasa. Todos estos mutantes de la colección de *Euroscarf* fueron transformados con el plásmido YEp352-*pMPL1-lacZ* y tratados durante 4 horas con 30 μ g/ml de rojo Congo, 0,8 unidades/ml de zimoliasa o SDS al 0,01%. Se representa la media y la desviación estándar del análisis de tres transformantes relativos al valor de 100% asignado a la cepa silvestre sin estímulo, con rojo Congo, zimoliasa o SDS en cada caso. Las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas con un p -value ≤ 0.05 en el caso de *psy2Δ*, *fyv10Δ*, *pog1Δ* y *srv2Δ* con todos los estímulos; *hkr1Δ*, *sho1Δ*, *tim18Δ*, *snt1Δ* y *scp160Δ* con rojo Congo y zimoliasa; *cmp2Δ* con zimoliasa y SDS; *hos2Δ* con rojo Congo; *csn12Δ* y *tip41Δ* con zimoliasa y *avo2Δ* con SDS.

Además, a través de ensayos de actividad β -galactosidasa utilizando *MLP1-lacZ* en ausencia del circuito IPAC, constatamos cómo estos mutantes cortan la inducción transcripcional de la ruta de integridad celular frente a alguno de los estreses probados (Figura 71). Como era de esperar, los mutantes *sho1 Δ* y *hkr1 Δ* presentan cortada toda la activación de la ruta en respuesta a zimoliasa aunque, también en presencia de rojo Congo tienen disminuida a la mitad esta activación. Entre los otros mutantes analizados hay que destacar *tim18 Δ* y *scp160 Δ* que prácticamente cortan toda activación de la ruta en presencia de los tres estreses de pared y *psy2 Δ* , *snt1 Δ* , *fyv10 Δ* y *pog1 Δ* que presentan una disminución de la inducción transcripcional de *MLP1* en torno al 50% en respuesta a rojo Congo, zimoliasa y SDS.

2.5.3. Los mutantes *scp160 Δ* , *bud27 Δ* y *sic1 Δ* presentan cortada la activación de la ruta en presencia de rojo Congo, zimoliasa y SDS

Por último, para confirmar que los resultados obtenidos con los mutantes de la colección de *Euroscarf* en los anteriores ensayos son consecuencia de las mutaciones específicas en esos genes, generamos de nuevo los mutantes *scp160 Δ* , *sic1 Δ* , *ume6 Δ* , *tim18 Δ* , *bud27 Δ* y *pfk26 Δ* mediante la delección de los mismos en la cepa BY4741 con la *cassette* de resistencia a kanamicina. Se analizó la inducción de la ruta de integridad celular mediante ensayos de actividad β -galactosidasa y observamos que de las 6 nuevas cepas, solo en los mutantes *scp160 Δ* , *bud27 Δ* y *sic1 Δ* la activación de la ruta en respuesta a rojo Congo, zimoliasa y SDS está reducida en torno al 50% (Figura 72A). Además el mutante *ume6 Δ* también muestra una disminución significativa en la inducción transcripcional de *MLP1* en respuesta a zimoliasa. Por otro lado, estudiamos la activación de la ruta CWI por *Western blotting* en estos cuatro mutantes y observamos cómo en todos ellos la fosforilación de Slt2 es similar a la mostrada en la cepa silvestre (Figura 72B). Por tanto, aunque en estos mutantes se produzca una reducción de la respuesta transcripcional a estímulos que activan la ruta CWI, la causa no parece ser una falta de activación de la MAPK Slt2.

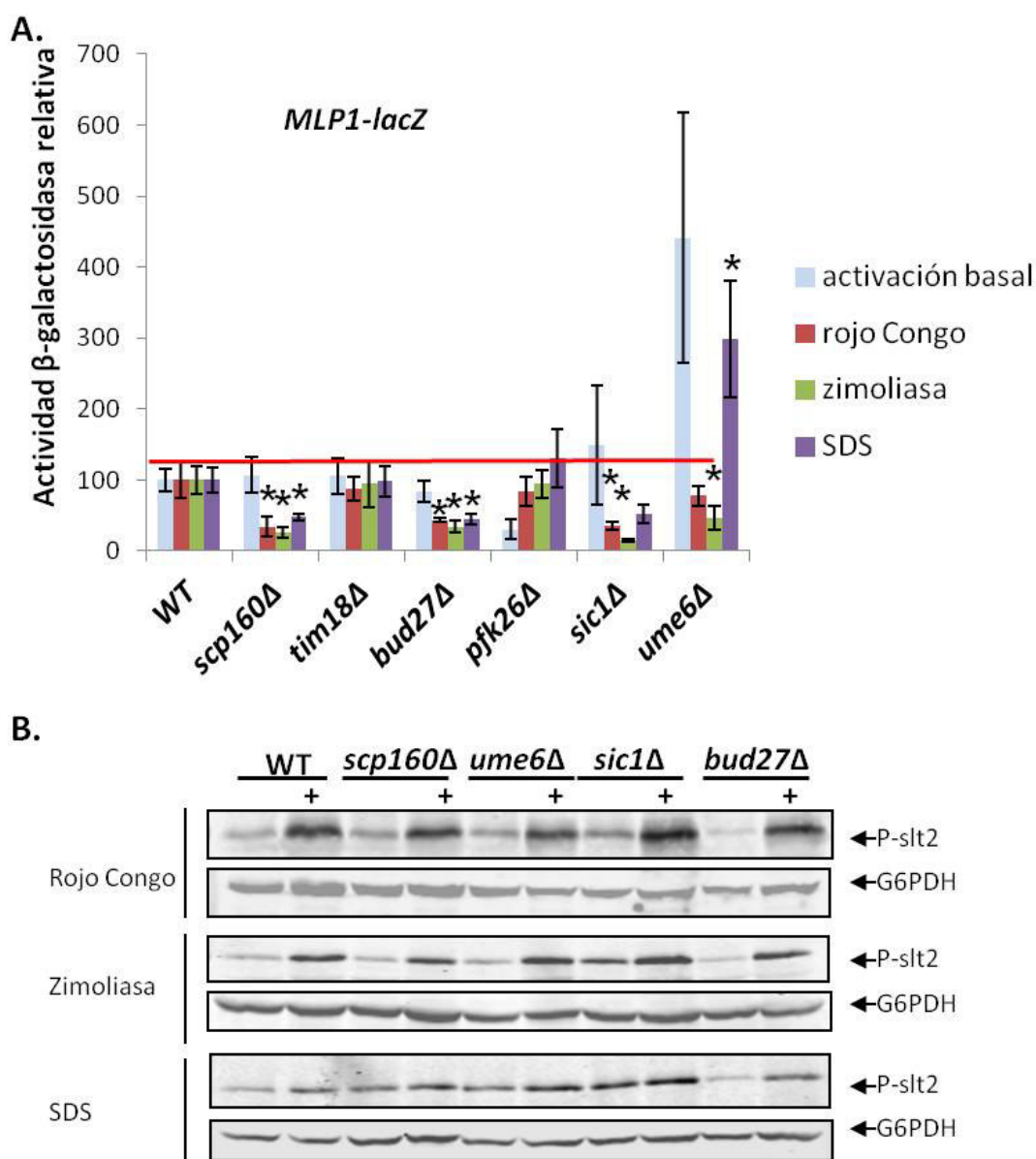


Figura 72: Activación de la ruta CWI en los mutantes *scp160Δ*, *bud27Δ*, *sic1Δ* y *ume6Δ* generados de nuevo y tratados con rojo Congo, zimoliasa o SDS. **A.** Análisis transcripcional de la ruta CWI determinada mediante actividad β -galactosidasa de las cepas BY4741, YES19 (*scp160Δ*), YES20 (*tim18Δ*), YES21 (*bud27Δ*), YES22 (*pfk26Δ*), YES23 (*sic1Δ*) e YES24 (*ume6Δ*) transformadas con el plásmido YEp532-*pMLP1-lacZ* y en presencia de 30 μ g/ml de rojo Congo, 0,8 unidades/ml o SDS al 0,01%. Se representa la media y la desviación estándar del análisis de tres transformantes independientes. Los valores fueron relativizados al valor de 100% asignado a la cepa silvestre sin estímulo, con rojo Congo, zimoliasa o SDS en cada caso. Un asterisco representa que las diferencias son estadísticamente significativas con un p -value \leq 0.05. **B.** Análisis mediante *Western blotting* de los niveles de activación de Slt2 detectados con anti fosfo-p44/42 de la cepa silvestre y los mutantes *scp160Δ* (YEA2), *ume6Δ* (YEA7), *sic1Δ* (YEA6) y *bud27Δ* (YEA4) tratados durante 4 horas con rojo Congo (30 μ g/ml), zimoliasa (150 μ g/ml) o SDS (0,01%).

2.5.4. Estudio de Scp160 como posible sustrato de Slt2

2.5.4.1. La sobreexpresión de Scp160 no suprime el fenotipo de un mutante *slt2Δ*

Scp160 es una proteína de unión a RNA y que se localiza asociada a la envuelta nuclear y al retículo endoplasmático. Fue identificada como un efector de la proteína G relacionada con la ruta de apareamiento ya que se asocia a la subunidad α Gpa1 y participa en el tráfico de RNA mensajero a sitios de polaridad en respuesta a un gradiente de feromonas (Gelin-Licht *et al.*, 2012). Por otro lado esta proteína está relacionada con el silenciamiento telomérico ya que su delección provoca una disminución en la deposición de Sir3 (*Silent Information Regulator*) (Marsellach *et al.*, 2006), cuya fosforilación por Slt2 acorta la longevidad de la levadura (Ray *et al.*, 2003).

Debido a que ambas proteínas están relacionadas con el silenciamiento telomérico y a que de acuerdo con nuestros resultados Scp160 parece estar actuando por debajo de Slt2, quisimos ver si la sobreexpresión de Scp160 suprimía la sensibilidad del mutante de delección de esta MAPK a zimoliasa y rojo Congo. Observamos que el fenotipo del mutante *slt2Δ* no se modifica por la sobreexpresión de esta proteína (Figura 73).

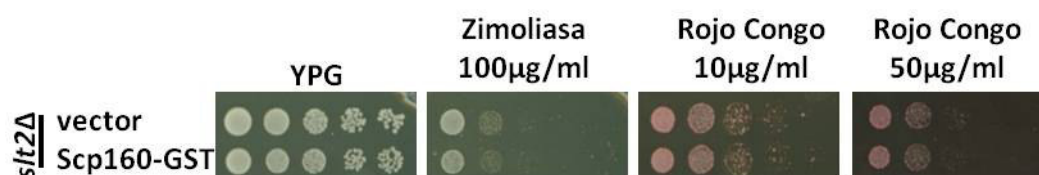


Figura 73: Estudio de supresión del fenotipo del mutante *slt2Δ* por la sobreexpresión de Scp160. Ensayo de crecimiento en gotas de diluciones decimales seriadas de la cepa mutante Y00993 (*slt2Δ*) transformada con el vector vacío pEGH-GST o pEGH-GST-SCP160 que sobreexpresan la proteína Scp160 fusionada a GST y bajo el control del promotor inducible por galactosa (*Open Biosystems*). Las células fueron cultivadas en placas de YPG suplementadas con 100μg/ml de zimoliasa o 10 y 100μg/ml de rojo Congo.

2.5.4.2. El fragmento amino-terminal de Scp160 (1-107) es tiofosforilado por Slt2-as en un ensayo quinasa *in vitro*.

Por otro lado estudiamos la posibilidad de que esta proteína fuera sustrato de Slt2. Para ello analizamos la secuencia aminoacídica de Scp160 e identificamos 9 posibles sitios de fosforilación por MAPKs (S/TP) (Figura 74). Para estudiar la fosforilación de Scp160 por Slt2-as mediante un ensayo quinasa *in vitro*, expresamos en *E. coli* en fusión a GST un fragmento de la proteína que corresponde a los primeros 107 aminoácidos y en el que están comprendidos 6 de estos residuos S/TP. Como se puede ver en la Figura 75, el fragmento amino-terminal de Scp160 aparece selectivamente tiofosforilado por GST-Slt2-as. Sin embargo, cuando se utilizó la proteína

GST-Scp160 completa expresada en levadura como sustrato en el ensayo quinasa, no se detectó tiofosforilación correspondiente a dicha proteína (Figura 75).

MSEEQTAIDSPSTVEGSVETVTIDSPSTASTIAATAEEHPQLEKKPTPLPSLKDLPSLGSNAAFANVKVSWGPNMKPA
VSNSPSPSPSAPSLTTGLGAKRMRSKNIQEAFTLDLQSQLSITKPELSRIVQSVKKNHDVSVESTLSKNARTFLVSGVAANV
HEAKRELVKKLTTPINAVIEVPSKCKASIIGSGGRTIREISDAYEVKINVSKEVNENSYDEDMDDTTSNVSLFGDFESVNLAK
AKILAIVKEETKNATIKLVVEDEKYLPIYDVSEFASDEGDDEEVKVQFYKKSQDIVILGPKEKAKATKTSIQDYLLKSLASNLDEEK
VKIPSKFQFLIDAELKEKYNVIVTFPS^{TP}DDELVSFVGLRDKVGEAITARSSSKSYVVESLDISKAHKNLTHAKNLMYFTK
YSVLKGLEESHPNVKISLPSIQSLPTAETVTIHISAKSDEANDIKAVRKELISFVNNIPPSETLVITDLDYELFGGSIKHCLLASES
SVAFVQFGDYYPNDNSILLVALTEDEDFKPSIEEIQALNKANESLNSLRKTQNNMETKTYEFSEEVQDSLFPSSATWKLIM
EDISEQEGHLQIKLH^{TPE}ENQLTVRGDEKAAKAANKIFESILN^{SP}SSKSKMTVNIPANSVARLIGNKGSNLQIQIREKFACQI
DIPNEENNNASKDKTVEVTLTGLEYNLTHAKKYLAEEAKKWADIITKELIVPVKFHGLIGPHGTYRNLQEKYNVFINFPR
DNEIVTIRGPSRGVNAHEELKALLDFEMENGHKMVINVPAEHVPRIIGKNGDNINDIRAEGVEMDFLQKSTDPKAE
TGEVELEITGSRQNIKDAAKRVESIVAEASDFVTEVLKIDHKYHKSIVGSGGHILREIISKAGGEEIRNKSVDIPNADSENKDIT
VQGPQKFVKVVEINKIVKDAENSVTKTIDIPAERKGAIGPGGIVRRQLESEFNINLFVPNKDDPSGKITITGAPENVEKA
EKKILNEIRENFREVDVPASIEYVSEGAIFIQKLRLDLSVNVFRGNTSKKANKLARAPIEIPLEKVCGSTEGENAETKFT
IEEVGAPTSSEEGDITMRLTYEPIDLSILSDGEEKEVTKDTSNDSAKKEALDTAVKLIKERIAKAPSATYAGYVWGADTRR
FNMIVGPGGSNIKKIREAADVIINVP RKSDKVNVDVYIRGTGAGVEKAGEMVLKSLRR

Figura 74. Secuencia aminoacídica de Scp160. Los motivos de fosforilación S/TP aparecen marcados en amarillo y la porción amino-terminal que se expresa en *E. coli* está subrayada.

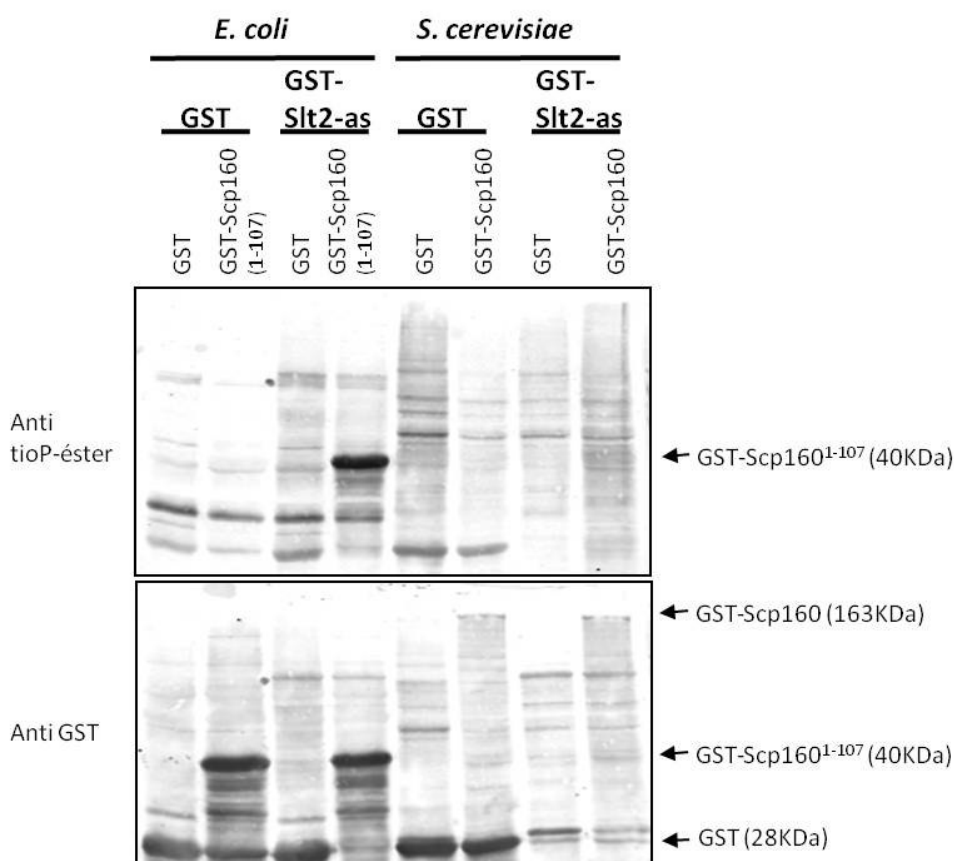


Figura 75: Ensayo proteína quinasa *in vitro* de Slt2-as sobre la región amino-terminal de Scp160 expresada en *E. coli* o sobre la versión completa de Scp160 expresada en *S. cerevisiae*. Análisis mediante *Western blotting* con anticuerpos anti-éster tiofosfato y anti-GST de las reacciones quinasa en la que se utiliza GST o GST-Slt2-as purificado procedentes de extractos de levadura y como sustrato, extractos de *E. coli* o levadura en los cuales se encuentran sobreexpresadas en fusión a GST el fragmento amino-terminal de Scp160 o la proteína completa, respectivamente.

2.5.4.3. Scp160 no interacciona con Slt2 en ensayos de copurificación

Para determinar si Scp160 era capaz de interactuar físicamente con Slt2, realizamos un ensayo de co-purificación expresando la versión completa de Scp160 fusionada a GST en una cepa que presenta Slt2 marcado con 6 copias del epítipo myc. Como control utilizamos la proteína Msg5 que se sabe que interacciona con Slt2 (Flández *et al.*, 2004). En la Figura 76 se observa que, a diferencia de lo que ocurre con Gst-Msg5, Slt2-myc no copurifica con GST-Scp160, lo que indica que en las condiciones ensayadas estas dos proteínas no muestran una interacción directa.

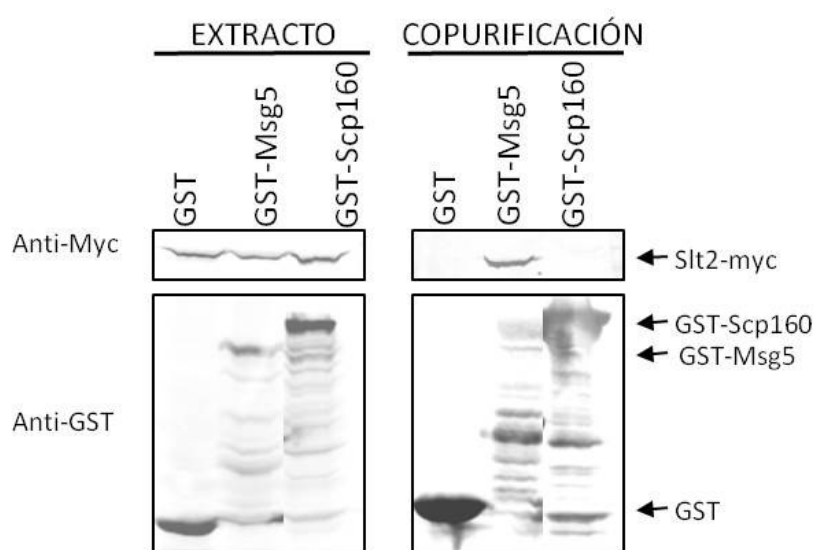


Figura 76: Ensayo de copurificación de Slt2-myc con la proteína Scp160 fusionada a GST. Análisis mediante *Western blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de co-purificación de la cepa YMF3 (*SLT2::6MYC*) transformada de manera individual con pEG(KG), pEG(KG)-MSG5 o pEGH-GST-SCP160 donde se expresan las proteínas Scp160 bajo el control del promotor *GAL1* y fusionadas a GST (*Open Biosystems*). Los extractos proteicos se incubaron en presencia de una matriz de glutatión (*Glutathione Sepharose*) y se utilizaron los anticuerpos anti-myc para detectar Slt2 y anti-GST para las distintas proteínas fusionadas a GST.



DISCUSIÓN

La pared celular de los hongos es una buena diana farmacológica para el diseño de antifúngicos ya que es una estructura esencial para la supervivencia celular y no está presente en eucariotas superiores. Un daño en pared provoca la activación de la ruta de integridad celular, desencadenándose una respuesta transcripcional responsable de contrarrestar el estrés de pared y garantizar así la supervivencia celular. Debido a esto, es de gran importancia incrementar nuestro conocimiento sobre compuestos capaces de alterar la pared fúngica y por tanto de activar la ruta CWI y los componentes que operan en esta ruta, así como los sustratos regulados por ella y por tanto en el mecanismo compensatorio adaptivo a un daño en pared. En esta Tesis hemos avanzado en esta dirección mediante el desarrollo de dos nuevas herramientas: una versión de Slt2 sensible a análogos de inhibidores de quinasas y un circuito genético de amplificación de la señal de la ruta CWI.

1. APLICACIONES DE UNA VERSIÓN DE SLT2 SENSIBLE A ANÁLOGOS DE INHIBIDORES DE PROTEÍN QUINASAS

Como hemos comentado en la introducción, una de las herramientas más poderosas para estudiar las funciones de las proteínas quinasas en los procesos de señalización, es el desarrollo de versiones sensibles a análogos voluminosos de inhibidores de estas quinasas, mediante la sustitución de un aminoácido de tamaño grande del sitio activo de la enzima por uno pequeño, como glicina o alanina. Esta modificación permite que estas quinasas sean inhibidas de manera selectiva, puntual y reversible. Para que esta estrategia funcione es necesario que la quinasa sea susceptible de sufrir esta mutación sin perder la actividad catalítica, y disponer de inhibidores potentes capaces de bloquear su actividad enzimática (Zhang *et al.*, 2013). En este trabajo mostramos cómo la proteína Slt2^{E108G}, que tiene sustituido el glutámico 108 por una glicina, sirve como versión Slt2-as al ser capaz, por una parte, de reemplazar funcionalmente a la proteína Slt2 silvestre y de activar a Rlm1 provocando la inducción transcripcional correspondiente, y por otra parte, de ser inhibida en su actividad catalítica de manera selectiva por distintos análogos derivados de pirazol-pirimidina (PP1), siendo el 2,3-DMBPP1 el más eficaz de los ensayados. Todo ello indica que esta versión de Slt2-as se comporta de acuerdo con lo esperado y puede ser, por tanto, utilizada para realizar estudios de funcionalidad de esta MAPK. De hecho, mediante la utilización de Slt2-as en este trabajo hemos podido caracterizar el papel de esta MAPK en ausencia de diversos genes cuya mutación estaba descrita que presentaba letalidad sintética con la delección de *SLT2*.

1.1. Estudio del efecto de la inhibición de Slt2-as en mutantes sintéticos letales con *slt2Δ*

De todos los dobles mutantes estudiados, solo *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* han mostrado una dependencia total de la actividad de Slt2, incluso a concentraciones bajas del inhibidor. El hecho de que los otros mutantes no presenten letalidad con *slt2-as* puede ser debido a que las concentraciones de inhibidor empleadas no sean suficientes para bloquear por completo la actividad enzimática de Slt2 y que la actividad residual de esta quinasa, aunque muy reducida, pueda ser suficiente para permitir la viabilidad. De hecho, un mutante sencillo *slt2-as* es algo menos sensible a rojo Congo en presencia del inhibidor que un mutante *slt2Δ*. Sin embargo en algunos de estos mutantes, como *pho85Δ* o *ppz1Δ*, la dependencia de la actividad de Slt2 si que se manifiesta cuando se someten a una situación de daño en la pared celular, como ocurre en presencia de CFW o cafeína. Por el contrario, en otros mutantes como *nbp2Δ* o *swi4Δ*, la inhibición de la actividad de Slt2 lo que provoca es una resistencia a algunas de estas condiciones de estrés. Nbp2 es una proteína adaptadora necesaria para reclutar hacia Bck1 a la fosfatasa Ptc1, implicada en la regulación negativa de la ruta CWI. Por ello, la ausencia de Nbp2 provoca una hiperactivación de Slt2, que se exagera aún más en situaciones de estimulación de la ruta, y que resulta muy deletérea para las células (Hruby *et al.*, 2011; Stanger *et al.*, 2012; Tatjer *et al.*, 2016). Esto podría explicar que la inhibición de la actividad enzimática de Slt2 mejore considerablemente el crecimiento del mutante *nbp2Δ* en esas condiciones. Por otra parte, Swi4 es un componente del factor de transcripción SBF (Breedon y Nasmyth, 1987) que juega cierto papel en la regulación de algunos genes de respuesta a estrés sobre la pared celular (Kim *et al.*, 2008; Kim y Levin, 2010), además de estar implicado en la regulación del ciclo celular y del crecimiento polarizado. Aunque en el mutante carente de Swi4 la ausencia de actividad Slt2 también afecta positivamente al crecimiento en presencia de CFW, este efecto es mucho menor que en el mutante *nbp2Δ* y debe producirse por otro mecanismo diferente ya que no se trata de un regulador negativo de la ruta.

Todos estos resultados apoyan la utilidad de la versión Slt2-as para este tipo de estudios, ya que nos han permitido, por un lado, poner de manifiesto que el requerimiento de la actividad catalítica de Slt2 no es igual de esencial para todos estos mutantes previamente descritos como sintéticos letales con *slt2Δ*; y por otro, constatar que la inhibición específica de la MAPK de la ruta CWI compromete drásticamente la viabilidad de las levaduras carentes de Gas1 o de Fks1, proteínas implicadas en la biosíntesis y maduración del β -1,3 glucano, incluso en ausencia de estrés sobre la pared celular. Se sabe que la deficiencia en estas proteínas desencadena la

activación de Slt2 y con ello del “mecanismo compensatorio” que provoca un incremento en el contenido de quitina (Smits *et al.*, 1999; Popolo *et al.*, 2001), cambios en la asociación entre diferentes polímeros de la pared (Kapteyn *et al.*, 1997) y un incremento de distintas manoproteínas de pared celular (Jung y Levin, 1999; Kapteyn *et al.*, 1999; de Nobel *et al.*, 2000) para mantener una pared estable. Si este mecanismo falla por la ausencia de la proteína Slt2 o de su actividad catalítica, las células no pueden compensar el defecto de la falta de β -1,3 glucano y esto determina la muerte celular, lo que explica tanto la letalidad sintética de los dobles mutantes de delección *gas1 Δ slt2 Δ* y *fks1 Δ slt2 Δ* previamente descrita, como la observada en este trabajo en los mutantes *gas1 Δ slt2-as* y *fks1 Δ slt2-as* en presencia del inhibidor. La ventaja de usar el alelo *slt2-as* es que nos ha permitido saber que cuando se inhibe específicamente y en un momento dado la actividad de Slt2 en estos mutantes se produce un incremento en la proporción de células con yemas pequeñas, lo que sugiere una parada del ciclo celular, probablemente en la fase S/G2, y una ausencia específica de Cdc10 en el anillo de septinas, lo cual indica que la actividad de Slt2 es necesaria para la integridad del anillo de septinas cuando la biosíntesis de β -1,3 glucano está comprometida.

Se ha descrito que tanto Slt2 como las septinas participan en el control del ciclo celular. Se sabe que para que la proteína quinasa Swe1 sea reclutada al cuello de la yema para su inactivación y degradación, es necesaria una polimerización correcta de los filamentos de septinas. Por ello, cuando se producen perturbaciones en la organización de estos filamentos, Swe1 se estabiliza y fosforila a Cdc28 unida a la ciclina B, lo que provoca su inhibición y la consecuente parada en G2 (Versele y Thorner, 2005). Se ha propuesto que en este proceso participa Slt2, que podría inhibir a la fosfatasa Mih1, la cual elimina la fosforilación de Cdc28 por parte de Swe1 (Harrison *et al.*, 2001). Todo esto podría establecer una relación entre la deslocalización de Cdc10 y la parada del ciclo celular observadas cuando falta la actividad Slt2 en los mutantes *gas1 Δ* y *fks1 Δ* . En esta misma línea, también se ha descrito el papel de otra MAPK, Hog1, sobre la localización de Swe1 en el anillo de septinas. Para que Swe1 esté en el anillo son necesaria tanto la quinasa Hsl1 como Hsl7, reclutadas por medio de interacción directa con Cdc11 y Cdc12 (Versele y Thorner, 2005), y la fosforilación de Hog1 sobre Hsl1 provoca su deslocalización del anillo de septinas y una parada en G2 (Clotet *et al.*, 2006). Además, recientemente Gas1 también ha sido implicada en el control del ciclo celular y en la respuesta a daño en el DNA, ya que el mutante carente de esta proteína presenta defectos en la activación del correspondiente *checkpoint*, no mostrando retraso en la transición G2-M en presencia de agentes genotóxicos (Eustice y Pillus, 2014). Esta función parece estar relacionada con su

implicación sobre la modulación de cromatina y el silenciamiento transcripcional que se ha descrito que ejerce Gas1 de forma independiente de su papel en la organización de la pared celular (Koch y Pillus, 2009).

Aunque no se haya establecido la existencia de una relación directa entre Slt2 y el anillo de septinas, se ha demostrado que en respuesta a un estrés del retículo endoplásmico (ER), se activa Slt2 a través de la ruta ERSU (*ER Stress Surveillance*) y se produce una alteración en el anillo de septinas para retrasar la herencia del ER de la célula madre a la hija y la citoquinesis (Babour *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha descrito recientemente que la quinasa Pkc1, de manera dependiente de Rho1, contribuye al ensamblaje de las septinas mediante la fosforilación de Syp1, una proteína asociada a la membrana en el cuello de la yema, donde colocaliza con las septinas (Merlini *et al.*, 2015). Aunque estos autores no descartan la participación de componentes de la ruta CWI por debajo de Pkc1 en este proceso de estabilización del anillo, parece que la acción de Pkc1 es al menos parcialmente independiente de la cascada de MAPK. Además Rho1 participa en la citoquinesis, mediando el ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina durante la anafase y regulando la formación del septo después de la mitosis, debido a la interacción con el PtdIns-4,5P₂, enriquecido en el cuello de la yema (Yoshida *et al.*, 2009). Rho1 también regula la polarización del citoesqueleto de actina (Kohno *et al.*, 1996; Evangelista *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1998), responsable en última instancia de la citoquinesis. Sin embargo, en nuestros experimentos de inhibición de la actividad de Slt2-as en los mutantes *gas1Δ* y *fks1Δ* no se observa alteración del citoesqueleto de actina, ni de la localización de Pkc1, la cual, junto con Rho1, se sitúa en el cuello entre la célula madre y la yema durante la mitosis (Denis y Cyert, 2005). Tampoco hemos detectado cambios en la localización del receptor Wsc1, que se sigue localizando en sitios de crecimiento polarizado (Delley y Hall, 1999; Straede y Heinisch, 2007). Por otra parte, se sabe que el anillo de septinas y el anillo de quitina colaboran para que ocurra una correcta división celular (Cabib y Schmidt, 2003; Schmidt *et al.*, 2003) y juntos desempeñan un papel esencial en el posicionamiento del anillo de actomiosina (Longtine y Bi, 2003; Dobbelaere y Barral, 2004). El hecho de que no observemos ninguna alteración en la localización de Myo1 en el mutante *gas1Δ slt2-as* tras la inhibición de la actividad de Slt2 sugiere que en estas condiciones el anillo de actomiosina se forma correctamente y que lo hace de manera independiente de la presencia de Cdc10 en el anillo de septinas. Curiosamente, la deslocalización de Cdc10 observada en células carentes de Fks1 o Gas1 y de actividad Slt2 no parece alterar tampoco la localización de otras septinas, ya que al menos Cdc3 sigue situada en el cuello entre la célula madre y la hija. Esto es coherente con el hecho de que un mutante

cdc10Δ sea viable a 24°C, lo que indica que esta septina no es esencial para la supervivencia celular (Barral *et al.*, 2000). Los estudios de interacción de septinas demuestran que estas proteínas se ensamblan formando heterooctámeros (-Shs1/Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11/Shs1-), que se asocian entre sí para formar los filamentos que conforman el anillo (Bertín *et al.*, 2008). Es muy probable que, al igual que ocurre en el mutante carente de Cdc10, aunque esta proteína no esté localizada correctamente, se pueden formar anillos en el cuello entre la célula madre y la hija con una organización anómala, en los que los filamentos estén formados por heterohexámeros (-Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc3-Cdc12-Cdc11-) que se ensamblan mediante una interacción Cdc3-Cdc3 atípica (McMurray *et al.*, 2011) (Figura 77).

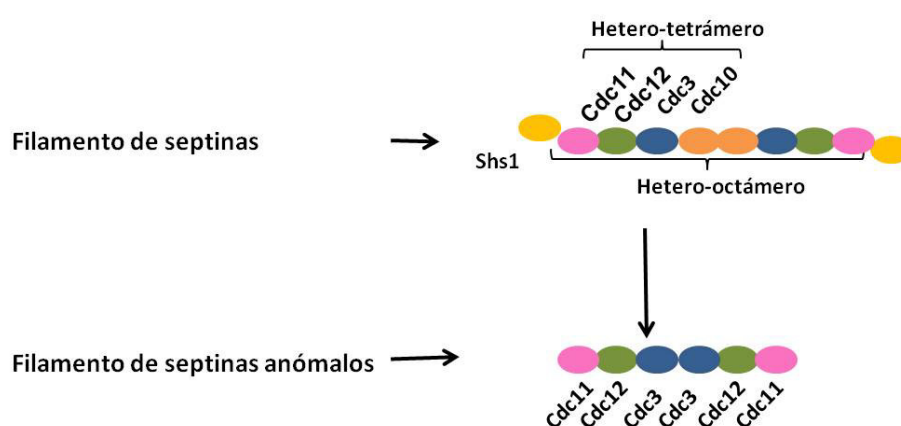


Figura 77: Organización de las septinas en heterooctámeros o heterohexámeros, en presencia y ausencia de Cdc10.

De acuerdo con nuestros resultados, una posibilidad a tener en cuenta es que Slt2 regule la organización del anillo de septinas en ciertas condiciones mediante fosforilación de alguna de estas proteínas, dado que se sabe que las septinas sufren modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, SUMOilaciones y acetilaciones, que tienen importantes efectos en su ensamblaje y función (Hernández-Rodríguez y Momany, 2012). Análisis mediante experimentos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) han puesto de manifiesto que el anillo de septinas presenta dos estados dinámicos diferentes, dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células. Durante la mayor parte del ciclo, el anillo de septinas se encuentra en un estado denominado inmóvil, estático o congelado (*frozen*) en el que no se detecta difusión lateral dentro de las subunidades de la estructura. Del mismo modo se ha demostrado la existencia de otro estado denominado fluido (*fluid*) en el que las septinas se reorganizan dentro del anillo y se intercambian con septinas citoplasmáticas (Douglas *et al.*, 2005). Este segundo estado coincide con la emergencia de la yema donde se está formando el anillo de septinas, y con la citoquinesis. Se ha propuesto que la dinámica del anillo está regulada

por fosforilación de las septinas, de modo que el establecimiento del estado inmóvil dependería principalmente de las quinasas Cla4 y Gin4, concretamente de la fosforilación directa de Shs1 por Gin4 aunque no se descartan otras septinas (Mortensen *et al.*, 2002; Egelhofer *et al.*, 2008), mientras que el estado fluido estaría propiciado por su desfosforilación por parte de la fosfatasa PP2A dependiente de su subunidad regulatoria Rts1 durante la citoquinesis (Dobbelaere *et al.*, 2003). De acuerdo a esto, en los mutantes *gas1Δ* y *fks1Δ*, Slt2 podría ser responsable de alguna fosforilación que favoreciera el estado inmóvil, por lo que su ausencia provocaría mayor fluidez al anillo y mayor intercambio de Cdc10 con el citoplasma. De hecho, en *Candida albicans* se ha demostrado que en el estado fluido, Cdc10 es la septina que más se intercambia con el citoplasma, de manera dependiente de Shs1 (González-Novo *et al.*, 2008).

Hasta el momento solo se ha descrito la fosforilación de Cdc10 en *S. cerevisiae* por quinasas de la familia PAK. Así, Versele y Thorner (2004) demostraron que Cla4 fosforila esta septina tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo responsable de más de la mitad de la fosforilación endógena de Cdc10, y que Ste20 y Skm1 son capaces de hacerlo en ensayos *in vitro* aunque con una eficiencia mucho menor. De hecho, se sabe que Ste20 contribuye a la localización de las septinas (Cvrckova *et al.*, 1995) y que la sobreproducción de Skm1 provoca aberraciones morfológicas (Martín *et al.*, 1997). Por tanto, Slt2 podría contribuir a la fosforilación residual de Cdc10 que no depende de Cla4, bien directamente o indirectamente a través de otras quinasas. La localización de Slt2 en sitios de crecimiento polarizado, incluyendo el septo de células en división (Van Drogen y Peter, 2002), estaría en consonancia con esta hipótesis. El requerimiento de la actividad de Slt2 para la correcta localización de Cdc10 solo se manifiesta, sin embargo, cuando faltan Gas1 o Fks1. Se sabe que Fks1 se localiza en zonas de crecimiento polarizado como la región del cuello entre la célula madre y la hija, y es responsable de la formación del β -1,3 glucano del septo secundario (Mazur y Baginsky, 1996; Qadota *et al.*, 1996), mientras que Gas1 se asocia a la quitina del septo y contribuye al tamaño del cuello y a la separación celular durante la citoquinesis (Rolli *et al.*, 2009). Por tanto, es posible que las deficiencias en la organización de la pared celular en la zona en la que se tiene que ensamblar el anillo de septinas, debidas a la ausencia de estas actividades, hagan necesaria la regulación ejercida por la fosforilación de Slt2 sobre dicha estructura.

1.2. La utilización de Slt2-as ha permitido identificar a Caf20, Rcn2 y Gga1 como nuevos sustratos de esta MAPK

Otra de las aplicaciones de las versiones de proteínas quinasas sensibles a análogos de ATP es la identificación de sustratos de dichas enzimas. La ampliación del bolsillo catalítico les permite acomodar análogos voluminosos de ATP que tienen sustituido el Y-fosfato por tiofosfato y transferir este tiofosfato a las proteínas sobre las que actúan en reacciones quinasas *in vitro*. Este método proporciona una ventaja significativa frente a los ensayos convencionales: la especificidad; ya que solo las quinasas modificadas pueden aceptar el análogo voluminoso con tiofosfato. Además, esta estrategia evita el uso de ATP radioactivo. De hecho con esta aproximación experimental, se han identificado 67 sustratos nuevos de Erk2, entre los que se encuentran factores de transcripción, proteínas implicadas en señalización, reguladores de la transcripción, proteínas relacionadas con el procesamiento del RNA y la traducción, así como proteínas relacionadas con el control del ciclo celular y la organización del citoesqueleto de actina (Carlson *et al.*, 2011). Es un ejemplo, no solo del potencial de esta metodología, sino del gran número de sustratos regulados por estas proteínas quinasas.

La limitación de este sistema es que no todas las quinasas-as utilizan eficientemente ATP-Y-S (Allen *et al.*, 2007). Sin embargo, en este trabajo hemos demostrado que la versión Slt2-as no sólo es inhibible por análogos de inhibidores de quinasas, sino que también es capaz de utilizar con alta especificidad N⁶-(feniletil)-ATP-Y-S para tiofosforilar sus sustratos, como el factor de transcripción Rlm1 o la MAPKK Mkk1, tanto expresados como proteínas recombinantes en *E. coli* como en la propia levadura. Además, gracias a esta estrategia hemos podido determinar que Slt2-as tiofosforila *in vitro* tanto la región regulatoria amino-terminal como la región carboxi-terminal en la que reside el dominio fosfatasa de otro de sus sustratos conocidos, la proteína fosfatasa de especificidad dual, Msg5.

Para disponer de Slt2-as activa en altas cantidades y poder purificarla fácilmente de los extractos de levadura para los ensayos *in vitro*, fue necesario expresar esta versión en un plásmido episómico, bajo el control del promotor inducible por galactosa y en fusión a GST. En estas condiciones observamos que no solo no se reduce la actividad de GST-Slt2-as, sino que es incluso superior a la de la proteína GST-Slt2 silvestre, lo que constituye una ventaja adicional en su utilidad para los ensayos quinasas. Este aumento de actividad de Slt2-as podría ser debido a un proceso de autoactivación, similar al descrito en el caso de la versión sensible a análogos de ATP de la MAPK Erk2 de mamíferos, la cual muestra una mayor autofosforilación como resultado de

la mutación en el bolsillo catalítico (Emrick *et al.*, 2006). Es también necesario mencionar que, aunque en los ensayos de tiofosforilación se detectan algunas bandas inespecíficas correspondientes a otras proteínas presumiblemente tiofosforiladas tanto utilizando GST-Slt2-as como únicamente GST, su intensidad es muy tenue. Esto puede deberse al hecho de que en estos ensayos exista, aunque en mucha menor medida, cierta utilización de este análogo de ATP por parte de otras posibles quinasas que queden retenidas inespecíficamente en las columnas con glutatión utilizadas en la purificación de GST o GST-Slt2-as, o bien existentes en los extractos proteicos de *E. coli* o de levadura utilizados para suministrar los sustratos.

Lo más interesante es que utilizando esta versión de Slt2 sensible a análogos de ATP hemos podido identificar nuevos sustratos de esta MAPK. Entre 15 posibles candidatos identificados previamente en un ensayo de fosfoproteómica por su fosforilación diferencial en sitios S/TP en condiciones de activación de la ruta CWI (Mascaraque *et al.*, 2013), hemos confirmado que Gga1, Caf20 y Rcn2, tanto expresados en *E. coli* como en levadura, son tiofosforilados *in vitro* por GST-Slt2-as. Además, hemos demostrado que estas tres proteínas interaccionan físicamente con Slt2, lo que corrobora la idea de que son sustratos directos de esta MAPK.

Caf20 es una proteína represora de la traducción de tipo 4E-BP que interacciona con el factor de iniciación eIF4E obstaculizando el reclutamiento de los ribosomas al extremo 5' de los RNAm (Altmann *et al.*, 1997). Se sabe que regula la traducción de un fracción significativa de los RNAm de la levadura, entre los que se encuentran los correspondientes a algunos genes relacionados con la pared celular (Cridge *et al.*, 2010). También se ha sugerido que podría regular el crecimiento filamentoso mediante el control de la traducción de RNAm de genes relacionados con este proceso, como *GPA2*, *CLN1* y *STE12*, que codifican el factor de transcripción de la ruta de pseudofilamentación (Park *et al.*, 2006). Además, la delección de *CAF20* aumenta la tasa de crecimiento en medios ricos y suprime parcialmente los efectos de mutaciones en los factores de iniciación de la traducción (Altmann *et al.*, 1997; de la Cruz *et al.*, 1997).

En cuanto al posible papel que juega la fosforilación en la regulación de Caf20 no se ha descrito nada en levadura, pero en células de mamíferos, la fosforilación de serinas y treoninas específicas modula la afinidad de los represores 4E-BP por el factor de iniciación eIF4E. Por ejemplo, se ha descrito que la fosforilación de 4E-BP1 por parte de mTOR y de ERKs impide esta

interacción y promueve la traducción (Lin *et al.*, 1994; Richter y Sonenberg, 2005). Por tanto, los represores 4E-BP pueden ser reguladores clave de la activación de la síntesis de proteínas en procesos de señalización celular, incluidas las rutas de MAPKs. Por otro lado, en levadura se ha encontrado que la regulación de la traducción después de un choque hiperosmótico leve es dependiente en gran medida de la MAPK Hog1 (Warringer *et al.*, 2010), aunque no se conoce el mecanismo molecular de este proceso. Nuestros resultados muestran que la MAPK Slt2 fosforila a Caf20 en la treonina 102, el mismo residuo que sufría un incremento de fosforilación en condiciones de activación de la ruta CWI en el análisis fosfoproteómico previo realizado por nuestro grupo (Mascaraque *et al.*, 2013), lo que sugiere que ésta podría ser una manera de regular la traducción en respuesta a un estrés sobre la pared celular.

Otro de los sustratos de Slt2 identificados es Rcn2, un regulador de la ruta de la calcineurina (RCAN). En levaduras existen 2 RCANs: Rcn1, considerado un RCAN canónico, y Rcn2, altamente divergente al faltarle los dominios de activación, pero cuya expresión también se induce por calcineurina (Mehta *et al.*, 2009). Esta serín-treonín fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina es muy importante en la fisiología eucariótica y está altamente conservada desde levaduras hasta humanos. En humanos está involucrada en procesos como la apoptosis neuronal, activación de células T, ciclo celular, homeostasis del calcio, y crecimiento y diferenciación del músculo cardíaco (Bhosale *et al.*, 2015). En levaduras está relacionada con la homeostasis del calcio, el apareamiento, la esporulación, la adaptación a altas concentraciones de sales y el ciclo celular (Liu *et al.*, 2015). La ruta de la calcineurina se estimula en presencia de Ca^{2+} y la activación de esta fosfatasa conlleva la desfosforilación de sustratos como el factor de transcripción Crz1.

Tanto en los mamíferos como en las levaduras, la regulación ejercida por los RCANs es bastante compleja ya que éstos pueden tanto inhibir como activar la señalización dependiente de la calcineurina y a su vez la calcineurina ejerce un control sobre estos reguladores (Davies *et al.*, 2007). En levadura, el regulador de la ruta de la calcineurina más ampliamente estudiado es Rcn1. Se sabe que este regulador inhibe la respuesta dependiente de la calcineurina cuando se sobreexpresa (Kingsbury y Cunningham, 2000), mientras que estimula esta señalización cuando se fosforila por Mck1, un miembro de la familia de quinasas GSK-3 (Hilioti *et al.*, 2004). Rcn1 tiene 2 sitios S/TP susceptibles de fosforilación por MAPKs: la serina 113 y la serina 117, que son coincidentes con la secuencia consenso de fosforilación por GSK-3: S/TXXXpS/pT (Woodgett, 2001). En un ensayo quinasas *in vitro* utilizando GST-Rcn1 y GST-Rcn1^{S113A} expresada en *E. coli*, y-

³²P[ATP] y Mck1 purificada de levadura se ha demostrado que para que Mck1 fosforile la serina 113, es necesario una fosforilación previa de Rcn1 por parte de una MAPK, como p42 de mamífero en la serina 117 (Hilioti *et al.*, 2004). En mamíferos, el homólogo de Rcn1, denominado RCAN1 o MCIP1, también es fosforilado por GSK-3 y por la MAPK ERK5/BMK1 (Vega *et al.*, 2002; Abbasi *et al.*, 2006), que es la homóloga a Slt2. Esto conduce a su disociación de la calcineurina y su asociación con la proteína 14-3-3, aliviando de este modo su efecto inhibitor sobre la actividad de la calcineurina. Nuestros datos indican que Slt2-as es capaz de tiofosforilar *in vitro* Rcn1 de levadura expresado en *E. coli*, lo que sugiere que esta MAPK podría ser la que fosforila la serina 117 requerida para la posterior fosforilación por Mck1 en la serina 113 en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la mutación en cualquiera de estas serinas o incluso en ambas no elimina la tiofosforilación de Rcn1 por Slt2-as en el ensayo quinasa, lo cual no estaría en consonancia con esa hipótesis. De todas maneras, el hecho de que la proteína mutante se tiofosforile no descarta que los sitios mutados sean sitios de fosforilación *in vivo* por la MAPK, ya que podría ocurrir que en ausencia de los sitios correctos de fosforilación se produjeran fosforilaciones espurias en un ensayo *in vitro*.

Rcn2 se identificó como otra RCAN de levadura cuya expresión es inducida fuertemente por la vía de la calcineurina (Mehta *et al.*, 2009), aunque se conoce mucho menos sobre su papel regulatorio. En este trabajo mostramos cómo Slt2 interacciona y fosforila Rcn2, confirmando datos previos obtenidos en un ensayo de interacción a gran escala (Ho *et al.*, 2002) y en nuestro ensayo fosfoproteómico (Mascaraque *et al.*, 2013), y además hemos identificado los sitios de fosforilación por esta MAPK. De los 4 posibles sitios S/TP de Rcn2, 3 de ellos (correspondientes a las serinas 152, 160 y 255) se tiofosforilan en el ensayo con Slt2-as, lo que desaparece por completo cuando estas serinas se cambian por alaninas. El hecho de que la mayor aportación a la tiofosforilación de Rcn2 en este ensayo *in vitro* sea debida a la serina 255, y que esta sea la única serina que apareció más fosforilada en condiciones de activación de la ruta CWI en el estudio fosfoproteómico (Mascaraque *et al.*, 2013), sugiere que éste sea el aminoácido fosforilado predominantemente por Slt2 *in vivo*.

La relación entre la ruta CWI y la señalización del Ca²⁺ ha sido ampliamente estudiada en *S. cerevisiae* y se ha descrito que alteraciones que afectan a la fluidez de la membrana, provocadas por un estrés térmico por ejemplo, generan cambios en el transporte de iones y también en la integridad de la pared celular. De hecho, el factor de transcripción de la ruta de la calcineurina Crz1 regula la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la pared

celular por el mecanismo compensatorio, y con la biosíntesis de lípidos de membrana y ergosterol (García *et al.*, 2004; Verghese *et al.*, 2012). También se ha descrito que en respuesta a un choque térmico, tanto la ruta CWI como la ruta de la calcineurina, regulan la expresión de *FKS2* de manera paralela, pero a través de elementos reguladores diferentes de la región promotora de este gen (Stathopoulos y Cyert, 1997; Zhao *et al.*, 1998). Además, en trabajos anteriores se ha propuesto que Slt2 regula la vía de la calcineurina en respuesta a estrés del retículo endoplásmico a través de dianas no conocidas de Slt2 (Bonilla y Cunningham, 2003). Nuestros resultados ponen de manifiesto que estos reguladores RCAN podrían ser un nexo de unión entre estas dos rutas.

Por último, también hemos identificado a la proteína Gga1 como sustrato de Slt2. Esta proteína contiene en su secuencia siete posibles sitios S/TP de fosforilación por MAPKs. Dado que en el estudio fosfoproteómico previo se identificaron péptidos que contenían dos de estos sitios (correspondientes a las serinas 375 y 378) diferencialmente fosforilados en condiciones de activación de la ruta CWI (Mascaraque *et al.*, 2013), es probable que éstos sean los residuos sobre los que actúa Slt2. Además, estos dos sitios también aparecen fosforilados en otro estudio a gran escala, en el que también encuentran ubiquitinación de Gga1, lo que sugiere una compleja regulación de la funcionalidad de este adaptador de clatrina (Swaney *et al.*, 2013).

Las GGAs son proteínas adaptadoras de clatrina conservadas desde levaduras a organismos superiores. Estas proteínas cooperan con proteínas del complejo AP-1 para regular el transporte selectivo de cargos desde el *trans*-Golgi (TGN) a endosomas y vacuolas (Bonifacino, 2004). En levaduras existen dos GGAs aparentemente redundantes: Gga1 y Gga2. El doble mutante *gga1Δ gga2Δ* presenta defectos en el tráfico de la carboxipeptidasa Y (CPY) y la proteinasa A a la vacuola y de la sintaxina Pep12 a endosomas tardíos, fallos en la maduración del factor α y fragmentación vacuolar (Mullins y Bonifacino, 2001). En cuanto a su regulación, inicialmente se describió que la fosforilación que sufren las GGAs en levadura, que también ocurre en células de mamífero (McKay y Kahn, 2004), afectaba a su interacción con los cargos (Doray *et al.*, 2002; Ghosh y Kornfeld, 2003), pero este mecanismo ha sido posteriormente cuestionado (Cramer *et al.*, 2010). Los estudios de interacción genética entre *SLT2* y los genes GGAs realizados en este trabajo conectan la ruta CWI con el tráfico de cargos del Golgi a la vacuola, en concreto con la vía de la carboxipeptidasa Y (CPY). Mientras que en ausencia de Gga2, Gga1 es suficiente para llevar a cabo este proceso correctamente, cuando además falta Slt2, Gga1 ya no es capaz de hacerlo. Por el contrario, Gga2 puede funcionar adecuadamente

aunque falten Gga1 y Slt2. Esto induce a pensar que Slt2 podría estar modulando específicamente la funcionalidad de Gga1 por fosforilación, de modo que en ausencia de la MAPK, Gga1 no estaría activa y el tráfico celular regulado por las GGAs dependería de la presencia de Gga2. Además, el análisis fenotípico en condiciones que suponen un daño para la pared celular corrobora la esencialidad de Gga2 también para hacer frente a esta situación cuando falta Slt2. Esto sugiere que para el mantenimiento de la integridad de la pared celular es importante que exista una regulación de Slt2 sobre Gga1 y una adecuada regulación del tráfico de cargos a la vacuola, ya que la falta de ambas GGAs también conduce a una mayor sensibilidad a estrés de pared. En este sentido, se sabe que la vía CPY no sólo regula el tráfico de la CPY y la proteínasa A, sino también de otras proteínas vacuolares como la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), y que mutaciones que afectan a componentes del complejo de la V-ATPasa provocan hipersensibilidad a estrés de pared (García *et al.*, 2015). Además, la reserva intracelular de Chs3, una quitín sintasa responsable de la mayoría de la síntesis de quitina de la pared celular, se mantiene mediante el tráfico de esta proteína entre el *trans*-Golgi (TGN) y los endosomas, regulado por las GGAs, AP-1 y de las proteínas relacionadas con epsinas Ent3 y Ent5 (Copic *et al.*, 2007). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que mutantes afectados en el adaptador endocítico de cargos AP-2 (Paczkowski *et al.*, 2015) o en el complejo conservado oligomérico de Golgi (COG) (Willett *et al.*, 2013), implicado en el tráfico *intra*-Golgi, también presentan interacciones negativas con mutantes de la ruta CWI (Martín *et al.*, 2015). Estos datos junto con los resultados de este trabajo apoyan la idea de que la ruta CWI podría modular el tráfico vesicular a distintos niveles como parte de su respuesta adaptativa a situaciones de estrés.

En resumen, hemos generado una nueva herramienta que ha resultado útil para identificar sustratos de la MAPK Slt2, cuya caracterización servirá para ampliar la información que se tiene de las conexiones de esta ruta de señalización con procesos celulares adicionales.

2. CIRCUITO DE AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL DE LA RUTA CWI

Para entender el funcionamiento de las rutas de señalización es necesario identificar y analizar los componentes de estas vías, así como los mecanismos que regulan su función e interacción. La mayoría de los componentes y mecanismos de señalización han sido identificados gracias inicialmente a la genética tradicional y a diferentes aproximaciones bioquímicas, y más recientemente a través de estudios a gran escala de colecciones de mutantes interactómica o fosfoproteómica, así como mediante la aplicación de modelos matemáticos y simulación

computacional. Estas estrategias han permitido saber que las rutas de señalización celular se configuran en forma de circuitos, con sus componentes interconectados en serie o en paralelo, por medio de interacciones físicas entre proteínas. Como en los circuitos eléctricos, la organización de estas rutas hace que sean susceptibles de modificación mediante la reconfiguración de los circuitos. Este tipo de intervención, más característica en principio de la ingeniería, ha ido ganando terreno en la investigación biológica de las últimas décadas con la denominación de biología sintética. Estas intervenciones abarcan modificaciones (i) de la organización espacial, por ejemplo secuestrando proteínas en determinados compartimentos celulares; (ii) de la composición de complejos, mediante la integración en los mismos de proteínas de otros circuitos tanto homólogos como heterólogos; (iii) de la relación activación/inactivación en intensidad o tiempo, a través de la alteración de las modificaciones postraduccionales o de la retroalimentación positiva o negativa; y (iv) de la especificidad, conectividad o vida media de los componentes de un circuito, mediante el uso de dominios específicos de interacción, adaptadores o conectores entre rutas, o señales de degradación (Kiel *et al.*, 2010; Furukawa y Hohmann, 2013). Si bien el principal objetivo de esta nueva disciplina es la construcción de circuitos sintéticos a partir de sus componentes con el fin de lograr nuevas funciones para aplicaciones específicas, también resulta muy útil para comprender cómo funcionan los circuitos naturales (Elowitz y Lim, 2010).

En este trabajo hemos estudiado los efectos y posibles aplicaciones de un circuito genético de amplificación continua de la señal de la ruta CWI creado artificialmente, basado en la retroalimentación positiva sobre la activación de la MAPK Slt2 que ejerce la expresión del alelo hiperactivo *MKK1*^{S386P} bajo el control del promotor del gen *MLP1*, cuya transcripción se induce cuando se activa dicha ruta. En presencia de este circuito que hemos denominado IPAC, las células muestran una gran sensibilidad a un daño en la pared debido a la hiperactivación de la ruta CWI, que resulta más deletérea que la ausencia de la propia MAPK. La explicación de este efecto es que, incluso en presencia de un nivel de estrés débil sobre la pared, este circuito provoca una amplificación continua de la señal y una activación persistente de la ruta CWI, que resulta letal para la célula. Esto sugiere que este circuito IPAC puede ser una herramienta muy útil, debido a su alta sensibilidad y especificidad, en la búsqueda de nuevos estímulos y componentes moduladores de la ruta CWI, los cuales pueden ser utilizados como antifúngicos, al alterar de manera específica la pared celular de los hongos.

2.1. Identificación de nuevos compuestos activadores de la ruta CWI

La hipersensibilidad a daño en pared provocada por el IPAC nos permitió realizar un rastreo sobre una colección de compuestos con el fin de identificar de forma sencilla nuevos activadores de la ruta de integridad celular. También se incluyeron algunos compuestos o condiciones cuya capacidad de estimulación de la ruta CWI ya se conocía y que nos sirvieron para validar el rastreo, como el ortovanadato sódico (Martín *et al.*, 2000), el pH alcalino (Serrano *et al.*, 2006), el agente tensoactivo SDS (de Groot *et al.*, 2001), el rojo Congo (Marín *et al.*, 2009) o la caspofúngina, un antifúngico comercial inhibidor de la β -1,3-glucan sintasa (Reinoso-Martín *et al.*, 2003). El hecho de que las cepas con IPAC fueran más sensibles que la cepa silvestre a estos tratamientos confirmó que nuestro sistema era eficiente para detectar compuestos activadores de la señalización a través de la ruta CWI. De esta manera, hemos identificado la neomicina, el clotrimazol, el cloruro de litio, el cloruro de zinc, el cloruro de cobalto, el EDTA y la difenilhidramina como nuevos estímulos de esta ruta. En presencia de neomicina, LiCl, EDTA y difenilhidramina, existe bastante diferencia entre el diámetro de halo observado en la cepa silvestre y la que porta el IPAC, lo que indica que la señal provocada por estos compuestos se transmite por el factor de transcripción Rlm1, el cual induce la expresión de *MLP1* y provoca la activación de este circuito. Esto concuerda con el mayor incremento en la fosforilación de Slt2 que inducen estos compuestos, en comparación con el cloruro de cobalto, el cloruro de zinc y el clotrimazol.

De todos los inhibidores de la síntesis de proteínas ensayados, la neomicina fue el único capaz de inducir de forma relevante la activación del IPAC. Este compuesto podría afectar a la expresión de proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular o componentes de la ruta CWI, desencadenando una activación de Slt2. De hecho, nuestro análisis transcriptómico indica que la respuesta desencadenada por la neomicina está principalmente relacionada con la biosíntesis de aminoácidos y síntesis proteica, y es similar a la mostrada en presencia de gentamicina y a la del mutante ribosomal *rp122Δ*, pero que también se activa la transcripción de genes relacionados con respuesta a estrés, señalización y biosíntesis de la pared, así como genes implicados en el metabolismo lipídico. Se ha descrito que este aminoglucósido, en células de mamíferos, se une con alta afinidad al PtdIns-4,5P₂ (Schacht, 1976; Lodhi *et al.*, 1979) por medio de interacciones electrostáticas y neutraliza la carga negativa del lípido (Gabev *et al.*, 1989). Si esto ocurre también en las levaduras, dicha interacción podría alterar la disponibilidad de este fosfoinosítido en la membrana celular. En este escenario, la expresión en respuesta a neomicina de genes relacionados con el metabolismo lipídico como *INO1* y *SUR1*, relacionados con la

síntesis de fosfolípidos y esfingolípidos, podría servir para contrarrestar su efecto sobre la membrana. Además, la ruta CWI ha sido relacionada con la homeostasis de lípidos, ya que esta ruta se activa y es esencial para la viabilidad de células crecidas en ausencia de inositol (Nuñez *et al.*, 2008). Por otra parte, no se puede descartar que la activación de la ruta CWI en presencia de neomicina sea una consecuencia indirecta de la alteración de algún proceso celular regulado por el PtdIns-4,5P₂, ya que este fosfoinosítido está implicado en la organización del citoesqueleto de actina y la endocitosis (Desrivieres *et al.*, 1998; Stefan *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007). De hecho, nuestro grupo de investigación ha descrito que la eliminación de PtdIns-4,5P₂, mediante su conversión a PtdIns-3,4,5P₃ por la expresión de la PI3K de humanos, causa defectos en estos dos procesos y desencadena una activación de la ruta CWI desde endosomas de reciclaje (Fernández-Acero *et al.*, 2015). Otra evidencia que conecta el proceso de endocitosis con la ruta de integridad celular es la interacción y fosforilación de Pkc1 sobre Apm4, una subunidad del complejo endocítico AP-2, que favorece el reclutamiento de este complejo a los sitios de endocitosis (Chapa y Ayscough, 2014). De hecho, la carencia de esta subunidad origina un incremento en la fosforilación de la MAPK Slt2 en condiciones de estrés de pared (Martín *et al.*, 2015). Debido a que en nuestros experimentos no observamos alteración del citoesqueleto de actina en presencia de neomicina, nos inclinamos a pensar que la activación de la ruta CWI, dependiente del posible bloqueo del PtdIns-4,5P₂ por este compuesto, podría ser debida a defectos en el tráfico de membranas ya que detectamos que el colorante lipofílico FM4-64 no sigue la cinética típica de internalización, aunque acabe llegando a las vacuolas. Por lo tanto, la neomicina podría activar la ruta CWI como resultado de una alteración de la ruta endocítica en los primeros pasos de la endocitosis.

Por otro lado, el tratamiento con neomicina también provoca una fragmentación vacuolar similar a la de los mutantes afectados en los genes *vps* (*vacuolar protein sorting*) de clase B (Bowers y Stevens, 2005), lo que concuerda con trabajos anteriores en los que se describe que este compuesto inhibe *in vitro* la fusión vacuolar tanto en levaduras (Mayer *et al.*, 2000) como en organismo superiores (Jost *et al.*, 1998). Sin embargo, este efecto no parece específico de la neomicina ya que también lo observamos con otro aminoglucósido, el G418. Además, también se ha encontrado una mayor sensibilidad a otro compuesto de este grupo de antibióticos, la gentamicina, en mutantes afectados en proteínas GARP (*Golgi-associated-retrograde-protein*), necesarias para el transporte retrógrado de Golgi y desde endosomas a Golgi, y proteínas del complejo HOPS (*HOmotypic vacuolar fusion and Protein Sorting*) que presentan un papel esencial en la ruta endosomal, y regulan la maduración, integridad y fusión

de las vesículas endosomales para formar los endosomas tardíos/MVB y la fusión de los MVB a las vacuolas (Blackburn y Avery, 2003).

El estudio de los componentes de la ruta CWI necesarios para transmitir la señal producida por la neomicina desde los sensores de membrana hasta Slt2, así como de las proteínas cuya ausencia conduce a sensibilidad frente a este aminoglucósido ha proporcionado resultados interesantes (Figura 78). Así, si bien en la detección de este estímulo participa Mid2, es el mutante que carece de Wsc1, el otro mecanosensor principal de la ruta, el que muestra un incremento de sensibilidad frente a este aminoglucósido, al igual que ocurre en presencia de rojo Congo (Bermejo *et al.*, 2010). Rom2 también participa en esta señalización. Se ha descrito que la interacción de Rom2 con el PtdIns-4,5P₂ de la membrana plasmática a través del dominio PH es necesaria para reclutar a esta GEF a sitios de crecimiento polarizado y ponerla así en contacto con los sensores y la GTPasa Rho1 (Philip y Levin, 2001). Sin embargo, otras evidencias apoyan que esta interacción no es imprescindible para la activación de Rho1, ya que Rom2 es capaz de transmitir la señal cuando el PtdIns-4,5P₂ es eliminado mediante la expresión de la PI3K humana (Fernández-Acero *et al.*, 2015) y que incluso un mutante *rom2* carente de los dominios PH presenta activada la ruta CWI (Lorberg *et al.*, 2001). De acuerdo a esto, aunque la unión de la neomicina al PtdIns-4,5P₂ bloquee la interacción de este fosfoinosítido con el dominio PH de Rom2, esta proteína podría transmitir la señal.

Nuestros resultados también indican la participación de Pkh1 y Slm1 en la señalización de la ruta CWI en respuesta a neomicina (Figura 78). Esto también es coherente con el papel de las quinasas Pkh1 y Pkh2 en la regulación del citoesqueleto de actina y la endocitosis (Schmidt *et al.*, 1997; Friant *et al.*, 2001; de Hart *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004), así como en el mantenimiento de la integridad celular, ya que constituyen una vía paralela a Rho1 para activar a Pkc1, a la que fosforilan (Inagaki *et al.*, 1999; Roelants *et al.*, 2002). La fosforilación de Slm1 es también dependiente de dichas quinasas (Daquinag *et al.*, 2007), aunque no se ha observado fosforilación directa; y esta proteína también parece mediar la activación de Slt2 en respuesta a neomicina. La activación de Pkh1/2 depende de la composición en esfingolípidos de membrana y no de los fosfoinosítidos (Liu *et al.*, 2005), si bien Slm1 tiene un dominio PH de unión al PtdIns-4,5P₂ (Daquinag *et al.*, 2007). Por tanto, la activación de la ruta CWI por neomicina estaría en parte mediada por la estimulación de Pkh1 ya sea directamente por una modificación de los lípidos de la membrana o indirectamente por el efecto sobre la endocitosis.

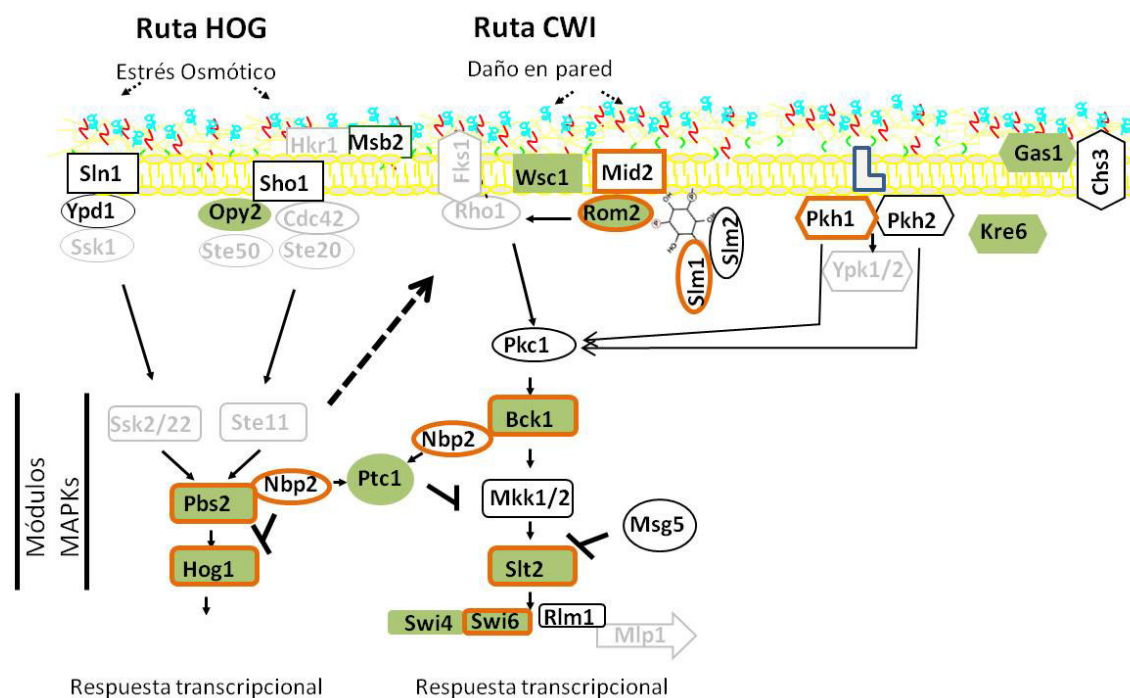


Figura 78: esquema representativo de los componentes de la ruta CWI, HOG y Pkh1/2 así como proteínas relacionadas con la biosíntesis de la pared o la unión a fosfoinosítidos Slm1/2, implicadas en la transmisión de la señal a Slt2 en respuesta a neomicina. En negro aparecen todas las proteínas analizadas, el fondo verde marca las necesarias para crecer en presencia de neomicina y las enmarcadas en naranja aquellas proteínas necesarias para transmitir la señal a Slt2.

Los componentes de la ruta HOG, Pbs2 y Hog1, también participan en la activación de Slt2 en respuesta a neomicina (Figura 78). Esta ruta se activa principalmente en respuesta a un aumento en la concentración de soluto disuelto en el medio (Hohmann *et al.*, 2009), aunque se ha demostrado que también se activa por estreses típicos de la ruta CWI como son un choque térmico (Winkler *et al.*, 2002), bajas temperaturas (Hayashi y Maeda, 2006; Panadero *et al.*, 2006) o daño en la pared celular por zimoliasa (Bermejo *et al.*, 2008). Como en la respuesta a neomicina, en la respuesta frente a zimoliasa es necesaria la actuación conjunta de ambas rutas (García *et al.*, 2009), pero mientras que con neomicina la señal es transmitida por Mid2, con zimoliasa no participa ninguno de los sensores de la ruta CWI y este estímulo es exclusivamente reconocido por Sho1 de la ruta HOG (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009; Bermejo *et al.*, 2010). La zimoliasa genera dos patrones transcripcionales diferentes: una respuesta principal relacionada con la adaptación a daños en la integridad de la pared celular, regulada por Slt2 y Rlm1, y una respuesta de adaptación a estrés osmótico llevada a cabo por Msn2/4, que incluiría los genes que responden a bajos niveles de activación de Hog1 (García *et al.*, 2009). En respuesta a neomicina parece ocurrir algo parecido ya que se activa la transcripción de algunos genes que están regulados por los factores de transcripción Rlm1 y Swi4 de la ruta CWI, y de otros regulados por Sko1 y Msn2/4 de la ruta HOG. Por otro lado, la eliminación de la fosfolipasa C

(Plc1), responsable de la degradación de PtdIns-4,5P₂, ha sido relacionada con la inducción de genes de respuesta a estrés general a través del factor de transcripción Msn2. En mutantes *plc1Δ* se produce una disminución de la actividad de PKA (proteín quinasa A dependiente de AMP cíclico), lo que provoca una disminución en la cantidad de Msn2 fosforilado, que va al núcleo y favorece la transcripción de genes de respuesta a estrés (Demczuk *et al.*, 2008). Dado que la neomicina se utiliza como inhibidor de PLC en células de mamíferos, presumiblemente por bloquear su actividad al unirse al PtdIns-4,5P₂, podría desencadenar la inducción de genes de respuesta a estrés dependientes de Msn2 a través de este mismo mecanismo en las células de levadura.

Uno de los resultados más sorprendentes es el obtenido a partir de las cepas carentes de la proteína fosfatasa Ptc1 y de su proteína adaptadora Nbp2, que recluta esta fosfatasa a las rutas CWI y HOG a través de su interacción con Bck1 y Pbs2, respectivamente, para ejercer su regulación negativa (Ota y Mapes, 2007; Hruby *et al.*, 2011). El hecho de que ambas proteínas operen en los mismos procesos hace que los mutantes presenten fenotipos similares (Stanger *et al.*, 2012). En el caso de la neomicina, Nbp2 es esencial en la transmisión de la señal, pero su falta no determina sensibilidad a este antibiótico. Sin embargo, con Ptc1 ocurre de manera inversa, ya que no es necesario para la señalización pero el mutante *ptc1Δ* es sensible a neomicina. La explicación más lógica sería que la función de Nbp2 en la señalización inducida por neomicina sea independiente de esta fosfatasa. En tal caso, la activación de la ruta CWI en respuesta a neomicina, provocada por la ausencia de la fosfatasa, generaría una hiperactivación letal de la ruta, lo cual no ocurriría en ausencia de Nbp2, ya que se cortaría la transmisión de este estímulo. Como proyecto de futuro, sería muy interesante buscar proteínas implicadas en la señalización en respuesta a neomicina que interaccionen con Nbp2.

Otro de los compuestos en el que centramos nuestro interés fue el clotrimazol. Los azoles son agentes antimicóticos que alteran la fluidez de la membrana plasmática fúngica, ya que inhiben la síntesis de ergosterol al actuar sobre la lanosterol 14α-desmetilasa, una enzima de tipo citocromo P450 (Abe *et al.*, 2009). Se ha determinado que en *C. albicans* el fluconazol compromete la integridad de la pared celular disminuyendo la secreción de proteínas relacionadas con el crecimiento hifal e incrementando la expresión de proteínas relacionadas con la remodelación de la pared (Sorgo *et al.*, 2011), además actúa disminuyendo la cantidad de glucano (Pfeller y Riley, 1992). Es decir, que el efecto que provocan los azoles en la membrana termina alterando la pared celular de esta levadura, como ocurre al aumentar la temperatura, lo

que dispara el “mecanismo compensatorio” mediado por la ruta de integridad celular que también existe en *C. albicans* (Heilmann *et al.*, 2013). En *S. cerevisiae* hay pocos estudios acerca del efecto de los azoles sobre su pared celular pero suponemos que estos compuestos, al igual que en *C. albicans*, alteran la integridad de la pared celular de manera indirecta tras su acción sobre la membrana plasmática. Esto concuerda con la mayor sensibilidad a azoles de la cepa que porta el IPAC y del mutante *gas1Δ*, que ya tiene defectos en la pared celular.

Sin embargo, uno de los resultados más interesantes que se observa solo con clotrimazol y no con el resto de los azoles ensayados, es la aparición de una proteína con menor movilidad electroforética que Slt2, pero reconocida tanto por los anticuerpos que detectan la proteína como por los específicos de su forma fosforilada. El hecho de que esta segunda banda correspondiente a Slt2 no aparezca ni en cepas carentes del motivo de activación -Thr-X-Tyr- de Slt2 (Lee *et al.*, 1993) ni en cepas que no presentan actividad catalítica de esta MAPK (*slt2^{K54F}*) (Martín *et al.*, 1993), indica que el cambio electroforético es dependiente de la propia activación de Slt2 inducida específicamente por el clotrimazol. Además, hemos confirmado que este efecto no parece ser debido a un proceso de autofosforilación, al menos en un sitio S/TP, ya que la mutación del único sitio susceptible de fosforilación por MAPKs de Slt2 no impide la aparición de la doble banda.

El clotrimazol, en ausencia de Slt2, activa la ruta de respuesta a alta osmolaridad. Esto puede ser debido a un entrecruzamiento de rutas totalmente espurio en esta situación. Sin embargo, también pudiera ser consecuencia de que si no existe una respuesta adecuada por parte de la ruta CWI, se requiera la ruta HOG para hacer frente al daño en la superficie celular provocado por los azoles. Se ha descrito que, al igual que la ruta CWI, la ruta HOG se activa en respuesta a un choque térmico en el que también se produce una alteración en la fluidez de la membrana (Winkler *et al.*, 2002) y se ha propuesto que ambas rutas cooperan para hacer frente al daño en pared provocado por la zimoliasa (Bermejo *et al.*, 2008; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010). Recientemente se ha demostrado que Ste11, a través de Nst1 que actuaría como proteína de andamiaje, fosforila Mkk1 y así conecta la ruta HOG y la de apareamiento con la ruta CWI para responder eficientemente a un choque térmico y al tratamiento con feromonas (Leng y Song, 2016). En presencia de clotrimazol además observamos una disminución en la fosforilación de Kss1 y Fus3, por lo que sería importante caracterizar en profundidad la interconexión entre todas estas rutas en estas condiciones.

Nuestros resultados han demostrado que este circuito de amplificación de la señal es una buena herramienta para la identificación de compuestos activadores de la ruta CWI, lo que abre la posibilidad de utilizarlo para buscar nuevos antifúngicos que tengan como diana la pared celular. La ventaja de este sistema es tanto su selectividad de acción como su elevada sensibilidad que puede permitir, por ejemplo, el rastreo de colecciones de extractos en los que el compuesto antifúngico puede estar en una concentración insuficiente para provocar la muerte celular utilizando una cepa silvestre de levadura o incluso un mutante *slt2Δ*, pero suficiente para inducir la letalidad en una cepa que porta el circuito.

2.2. El circuito IPAC permite identificar componentes moduladores de la ruta CWI

Los rastreos genómicos a gran escala, empleando colecciones de mutantes carentes en genes no esenciales, han aportado importantes contribuciones al conocimiento de la fisiología celular o de las rutas de transducción de señales en *S. cerevisiae*, ya que permiten identificar genes cuya ausencia implica la supresión o la potenciación de un fenotipo en particular. De este modo se han descubierto mutaciones que conducen a la activación constitutiva de la ruta CWI (Arias *et al.*, 2011), identificado genes necesarios para generar una respuesta adaptativa común a distintos estreses de pared y funciones necesarias para mantener la integridad celular (García *et al.*, 2015), así como genes relacionados con la regulación de la actina, de la pared celular y de la síntesis y reparación del DNA (Tong *et al.*, 2004). En este trabajo, la combinación del circuito IPAC con una colección de mutantes en genes no esenciales nos ha permitido identificar genes que codifican posibles componentes reguladores de la ruta CWI por la capacidad de los correspondientes mutantes de aliviar la hipersensibilidad a daños en pared inducido por el IPAC.

Una de las categorías funcionales más representadas dentro del grupo de mutantes capaces de cortar la hiperactivación de la ruta CWI fue la relacionada con proteínas implicadas en el control de la expresión génica a través de la remodelación de la cromatina en respuesta a diversas situaciones de estrés (que incluye genes como *UME6*, *SNT1*, *HOS2*, *POG1*), lo que revela la importancia de la regulación transcripcional en la señalización celular. Esta categoría de genes está también incluida dentro del conjunto de genes necesarios para el mantenimiento de la integridad de la pared, que han sido denominados “*cell wall maintenance*” (CWM) por García y colaboradores (2015). En este trabajo se observó que el mutante *ume6Δ*, deficiente en una enzima implicada en la desacetilación de histonas (Lardenois *et al.*, 2015), era hipersensible a rojo Congo, aunque al no mostrar fenotipo en presencia de zimoliasa y caspofungina, no fue incluido en el conjunto de genes CWM. En nuestro trabajo, este mutante reduce la respuesta

transcripcional de la ruta CWI en presencia de rojo Congo y zimoliasa, lo que demuestra su participación en la ruta CWI en respuesta de estrés de pared. Por otro lado, hemos encontrado que otras desacetilasas de histonas como Hos2 y Snt1 también participan en este proceso y en el trabajo de García y colaboradores (2015), aunque los mutantes en estas proteínas no fueron identificados como hipersensibles a un daño en pared, otros mutantes deficientes en enzimas implicadas en la acetilación y desacetilación de histonas han sido identificados, como *asf1Δ* y *spt10Δ*, así como mutantes en proteínas asociadas a la RNA polimerasa II o implicados en la modificación y remodelación de la cromatina. Todos estos resultados son coincidente con la necesidad de que se produzca una remodelación de la cromatina para una respuesta transcripcional adecuada en presencia de un daño en la pared (Sanz *et al.*, 2012).

Otros posibles reguladores de la ruta CWI son proteínas relacionadas con el control del crecimiento y el ciclo celular, ya que tanto en ausencia de Sic1, inhibidor de quinasas asociadas a ciclinas, que impide la entrada en fase S, como de Avo2, proteína del complejo TORC2 relacionada con el control del crecimiento celular, se produce una disminución en la expresión de *MLP1* en respuesta a estrés de pared. Se ha descrito que la ruta CWI ejerce cierto papel en el control del ciclo celular, ya que se sabe que Slt2 actúa inhibiendo la fosfatasa Mih1 provocando así un desequilibrio hacia la fosforilación de Cdc28 y una parada del ciclo celular (Harrison *et al.*, 2001), y que el factor de transcripción SBF activa la expresión de las ciclinas de la fase G1 (Cln1, Cln2, Pcl1 y Pcl2) que se unen a Cdc28 regulando la transición de fase G1 a S (Iyer *et al.*, 2001). Además recientemente se ha descrito que en respuesta a rapamicina, Slt2 fosforila Sic1, evitando así su degradación (Moreno-Torres *et al.*, 2015). Sic1 sería por tanto una proteína muy regulada por MAPKs ya que Hog1, en condiciones de alta osmolaridad, interacciona y fosforila a Sic1 deteniendo el ciclo celular en G1 (Duch *et al.*, 2012). Pero poco se conoce del control que ejerce el ciclo celular sobre la regulación de la ruta CWI. Se ha observado que células que expresan un versión estable de Hsl1, quinasa implicada en morfogénesis, son sensibles a cafeína e incapaces de activar Slt2, y que células que expresan una versión parcialmente estable de Clb2, ciclina asociada a Cdc28 para promover el paso de G2 a M, son sensibles a diferentes estreses de la ruta CWI, posiblemente debido a niveles reducidos de Sic1 (Simpson-Lavy *et al.*, 2009). Además, proteínas implicadas en el control del ciclo celular, como la quinasa dependiente de ciclinas pho85, o las ciclinas Cln2 y Clb2, también participan en la regulación de la ruta CWI (García *et al.*, 2015). Todos estos resultados confirmarían que el control del ciclo celular es importante para hacer frente al estrés de pared celular.

Los mutantes *scp160Δ*, *bud27Δ* y *csn12Δ* también reducen la activación transcripcional de la ruta inducida por el IPAC. Estas proteínas están relacionadas con la traducción o el metabolismo del RNA, ya que Scp160 es una proteína de unión a RNA necesaria para la traducción eficiente de un gran número de RNAm a través del reciclaje de RNAt (Hirschmann *et al.*, 2014), Bud27 es una proteína involucrada en el inicio de la traducción (Mirón-García *et al.*, 2013) y Csn12, junto con Thp3, se cree que participa en la elongación de la transcripción y/o en el *splicing* del RNAm (Jimeno *et al.*, 2011). Dado que Slt2 se fosforila correctamente en respuesta a estrés de pared en estos mutantes, estas proteínas deben jugar un papel importante en una correcta expresión de los genes regulados por la ruta. En el trabajo de García y colaboradores (2015), no se identificó *CSN12* pero sí *THP3*, entre los genes cuya mutación confiere hipersensibilidad a estreses de pared. Además, en dicho trabajo el mutante *scp160Δ* mostró hipersensibilidad a rojo Congo, zimoliasa y caspofungina y una respuesta transcripcional defectuosa de la ruta CWI bajo situaciones que alteran la pared celular (García *et al.*, 2015). Aunque en nuestros ensayos quinasa *in vitro* no observamos tiofosforilación de la proteína Scp160 completa, un fragmento expresado en *E. coli* correspondiente a la región amino-terminal de esta proteína, que contiene 6 de los 9 posibles sitios de fosforilación por MAPKs, sí se tiofosforila por Slt2-as. Tampoco hemos podido demostrar que exista una interacción directa entre Scp160 y Slt2, pero hay ocasiones en las que la unión entre la enzima y su sustrato es transitoria y no es suficiente para ser detectada en ensayos de copurificación. Por tanto, no se puede descartar que Scp160 sea un sustrato de Slt2. De hecho, se sabe que ambas proteínas están implicadas en silenciamiento telomérico, ya que la delección de Scp160 provoca una disminución en la deposición de Sir3 en el DNA (*Silent Information Regulator*) (Marsellach *et al.*, 2006) y Slt2 fosforila Sir3 (Ray *et al.*, 2003). La fosforilación de Slt2 sobre Scp160 podría complementar la función de Slt2 en este proceso celular.

Por otro lado, Scp160 se ha relacionado con la formación de *p-bodies*, estructuras citoplasmáticas que se generan en respuesta a estrés para almacenar los RNAm que no van a ser traducidos (Parker y Sheth, 2007). Estos *p-bodies* se localizan próximos al ER e interactúan con Scp160. En ausencia de estrés, Scp160 se une a los polisomas activos favoreciendo la traducción de los RNAm e impidiendo la formación de los *p-bodies* (Weidner *et al.*, 2014). La asociación de los *p-bodies* a la membrana del ER no es dependiente de la interacción entre Scp160 y Dcp2, un componente de estas estructuras, sino que depende de la fosforilación de Dcp2 por Ste20. Se ha demostrado que los polisomas asociados al ER están enriquecidos en la forma fosforilada de Dcp2 y esta fosforilación también es necesaria para la formación de los *p-bodies* (Yoon *et al.*,

2010). La proteína Scp160 es necesaria para mantener los niveles de Dcp2 fosforilado (Weidner *et al.*, 2014), por lo que mediante la fosforilación de Scp160, Slt2 podría estar participando en este proceso. En este mismo sentido, es interesante destacar que otra proteína que también está implicada en la formación de los *p-bodies* es la proteína represora de la traducción Caf20 (Altmann *et al.*, 1997). En respuesta a feromonas, la sobreexpresión de Caf20 en un mutante *dhh1Δ*, carente en una helicasa que forma parte de estas estructuras actuando como activador del *decapping* de RNAm, incrementa la expresión del factor de transcripción Ste12 y recupera la formación de los *p-bodies* (Ka *et al.*, 2008). En nuestro trabajo hemos demostrado que esta proteína es fosforilada por Slt2, por lo que esta fosforilación, podría contribuir a la aparición de *p-bodies* al alterar la traducción de diversos RNAm.

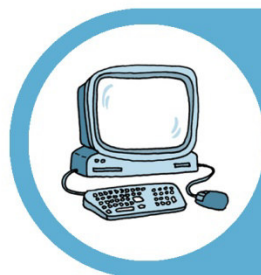
En resumen, podemos concluir que los rastreos a gran escala utilizando este circuito IPAC de amplificación de la señal en la ruta CWI constituyen una estrategia alternativa y complementaria a otro tipo de rastreos genómicos útil para identificar nuevos componentes moduladores de esta ruta de transducción de señales, involucrados bien en el mantenimiento de la integridad celular o bien en otras funciones que pueden ser desveladas gracias a estos estudios.



CONCLUSIONES

1. La mutación del glutámico 108 por glicina en el bolsillo de unión a ATP de Slt2 genera una versión de esta MAPK sensible a análogos de ATP, Slt2-as, funcional e inhibible por derivados de pirazol-pirimidina (PP1).
2. La inhibición de Slt2 en los mutantes *gas1Δ slt2-as* y *fks1Δ slt2-as* detiene su crecimiento, mostrando la mayoría de las células yemas pequeñas y deslocalización de la septina Cdc10.
3. La capacidad de Slt2-as para utilizar N⁶-(feniletil)-ATP-γ-S y tiofosforilar *in vitro* al factor de transcripción Rlm1, la MAPKK Mkk1, y la fosfatasa Msg5, indica su utilidad para la identificación de sustratos de esta MAPK.
4. Las proteínas Caf20, Rcn2 y Gga1 interaccionan con Slt2 y son tiofosforiladas por Slt2-as cuando son expresadas tanto en levadura como en *E. coli*, lo que sugiere su papel como sustratos de esta MAPK en condiciones fisiológicas.
5. La tiofosforilación por parte de Slt2-as de Caf20 ocurre en la treonina 102 y de Rcn2 en las serinas 152, 160 y 255.
6. Las mutaciones *gga2Δ* y *slt2Δ* presentan una interacción genética negativa en condiciones de estrés sobre la pared celular. La combinación de ambas mutaciones altera el tráfico de proteínas a través de la vía CPY.
7. La expresión del alelo *MKK1^{S386P}*, bajo el control del promotor del gen *MLP1*, configura un circuito de retroalimentación positiva de la ruta CWI (IPAC) que conduce, en condiciones de estimulación, a una amplificación continua de la señal que resulta letal. Las células con el IPAC son por tanto hipersensibles a agentes que activan la ruta CWI.
8. La utilización del circuito IPAC nos ha permitido identificar a la neomicina, el SDS, el EDTA, el LiCl, la difenilhidramina, el CoCl₂, el ZnCl₂ y el clotrimazol como activadores de la ruta CWI.
9. El tratamiento con neomicina desencadena una respuesta transcripcional relacionada con la biosíntesis de aminoácidos y, en menor medida, con una respuesta general a estrés, incluido el osmótico y el de pared celular.
10. En la activación de Slt2 por neomicina, además de los componentes de la ruta CWI a través de Mid2, participan Pkh1, Slm1 y Nbp2 así como los elementos de la ruta HOG Pbs2 y Hog1.
11. El clotrimazol provoca la aparición de dos formas de fosfo-Slt2 de diferente movilidad electroforética, de manera dependiente tanto de la integridad del sitio de activación como de la actividad catalítica de esta MAPK.

12. Slt2 es esencial para la especificidad de transmisión de la señal a través de la ruta CWI en respuesta a clotrimazol ya que, en ausencia de esta MAPK, este antifúngico provoca la fosforilación de Hog1.
13. El circuito IPAC ha permitido la identificación de Scp160, Bud17 y Sic1 como proteínas necesarias para una máxima respuesta transcripcional frente a condiciones activadoras de la ruta CWI.



BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, S., Lee, L.D., Su, B., Chen, X Alcon, J.L., Yang, J., Kellems, R.E., and Xia, Y. (2006). Protein kinase-mediated regulation of calcineurin through the phosphorylation of modulatory calcineurin-interacting protein 1. *J Biol Chem* 281, 7717-7726.
- Abe, F., Usui, K., and Hiraki, T. (2009). Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 48, 8494-8504.
- Agarwal, A.K., Rogers, P.D., Baerson, S.R., Jacob, M.R., Barker, K.S., Cleary, J.D., Walker, L.A., Nagle, D.G., and Clark, A.M. (2003). Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 34998-35015.
- Aguilar, R.C., Watson, H.A., and Wendland, B. (2003). The yeast Epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions. *J Biol Chem* 278, 10737-10743.
- Aimaniananda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., and Latge, J.P. (2009). Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. *J Biol Chem* 284, 13401-13412.
- Alberts, A.S., Bouquin, N., Johnston, L.H., and Treisman, R. (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem* 273, 8616-8622.
- Alepuz, P.M., Jovanovic, A., Reiser, V., and Ammerer, G. (2001). Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* 7, 767-777.
- Alic, N., Higgins, V.J., Pichova, A., Breitenbach, M., and Dawes, I.W. (2003). Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 41849-41855.
- Altmann, M., Schmitz, N., Berset, C., and Trachsel, H. (1997). A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *EMBO J* 16, 1114-1121.
- Allen, J.J., Li, M., Brinkworth, C.S., Paulson, J.L., Wang, D., Hubner, A., Chou, W.H., Davis, R.J., Burlingame, A.L., Messing, R.O., *et al.* (2007). A semisynthetic epitope for kinase substrates. *Nat Methods* 4, 511-516.
- Andrews, B.J., and Herskowitz, I. (1989). Identification of a DNA binding factor involved in cell-cycle control of the yeast HO gene. *Cell* 57, 21-29.
- Andrews, P.D., and Stark, M.J. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J Cell Sci* 113 (Pt 15), 2685-2693.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- Araki, T., Toh-e, A., Kikuchi, Y., Watanabe, C.K., Hachiya, T., Noguchi, K., Terashima, I., and Uesono, Y. (2015). Tetracaine, a local anesthetic, preferentially induces translational inhibition with processing body formation rather than phosphorylation of eIF2alpha in yeast. *Curr Genet* 61, 43-53.
- Arias, P., Díez-Muñiz, S., García, R., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2011). Genome-wide survey of yeast mutations leading to activation of the yeast cell integrity MAPK pathway: novel insights into diverse MAPK outcomes. *BMC Genomics* 12, 390.
- Arroyo, J., Bermejo, C., García, R., and Rodríguez-Peña, J.M. (2009). Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 1, 44-46.
- Arroyo, J., Hutzler, J., Bermejo, C., Ragni, E., García-Cantalejo, J., Botias, P., Piberger, H., Schott, A., Sanz, A.B., and Strahl, S. (2011). Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast. *Mol Microbiol* 79, 1529-1546.
- Audhya, A., and Emr, S.D. (2002). Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev Cell* 2, 593-605.
- Audhya, A., Loewith, R., Parsons, A.B., Gao, L., Tabuchi, M., Zhou, H., Boone, C., Hall, M.N., and Emr, S.D. (2004). Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J* 23, 3747-3757.
- Ault, A.D., Fassler, J.S., and Deschenes, R.J. (2002). Altered phosphotransfer in an activated mutant of the *Saccharomyces cerevisiae* two-component osmosensor Sln1p. *Eukaryot Cell* 1, 174-180.
- Ayscough, K.R. (2000). Endocytosis and the development of cell polarity in yeast require a dynamic F-actin cytoskeleton. *Curr Biol* 10, 1587-1590.

- Babour, A., Bicknell, A.A., Tourtellotte, J., and Niwa, M. (2010). A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* **142**, 256-269.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., and Andrews, B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slr2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol* **21**, 6515-6528.
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3254-3259.
- Balasubramanian, M.K., Bi, E., and Glotzer, M. (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* **14**, R806-818.
- Baldi, P., and Long, A.D. (2001). A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* **17**, 509-519.
- Bandyopadhyay, S., Mehta, M., Kuo, D., Sung, M.K., Chuang, R., Jaehnig, E.J., Bodenmiller, B., Licon, K., Copeland, W., Shales, M., *et al.* (2010). Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science* **330**, 1385-1389.
- Barral, Y., and Kinoshita, M. (2008). Structural insights shed light onto septin assemblies and function. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 12-18.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M.S., and Snyder, M. (2000). Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell* **5**, 841-851.
- Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., and Snyder, M. (1999). Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* **13**, 176-187.
- Belli, G., Gari, E., Aldea, M., and Herrero, E. (2001). Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **39**, 1022-1035.
- Bermejo, C., García, R., Straede, A., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., Heinisch, J.J., and Arroyo, J. (2010). Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of wsc1 and mid2 deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **14**, 679-688.
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Rodríguez de la Concepcion, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F., and Arroyo, J. (2008). The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**, 1113-1124.
- Bertín, A., McMurray, M.A., Grob, P., Park, S.S., García, G., 3rd, Patanwala, I., Ng, H.L., Alber, T., Thorner, J., and Nogales, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8274-8279.
- Bertín, A., McMurray, M.A., Thai, L., García, G., 3rd, Votin, V., Grob, P., Allyn, T., Thorner, J., and Nogales, E. (2010). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J Mol Biol* **404**, 711-731.
- Bettinger, B.T., Clark, M.G., and Amberg, D.C. (2007). Requirement for the polarisome and formin function in Ssk2p-mediated actin recovery from osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**, 1637-1648.
- Bhosale, G., Sharpe, J.A., Sundier, S.Y., and Duchon, M.R. (2015). Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann N Y Acad Sci* **1350**, 107-116.
- Bi, E. (2001). Cytokinesis in budding yeast: the relationship between actomyosin ring function and septum formation. *Cell Struct Funct* **26**, 529-537.
- Bi, E., and Park, H.O. (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* **191**, 347-387.
- Bickle, M., Delley, P.A., Schmidt, A., and Hall, M.N. (1998). Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J* **17**, 2235-2245.
- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., and Sunnerhagen, P. (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* **53**, 1743-1756.
- Bishop, A., Buzko, O., Heyeck-Dumas, S., Jung, I., Kraybill, B., Liu, Y., Shah, K., Ulrich, S., Witucki, L., Yang, F., *et al.* (2000a). Unnatural ligands for engineered proteins: new tools for chemical genetics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 577-606.
- Bishop, A.C., Buzko, O., and Shokat, K.M. (2001). Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell Biol* **11**, 167-172.
- Bishop, A.C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C., and Shokat, K.M. (1998). Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol* **8**, 257-266.

- Bishop, A.C., and Shokat, K.M. (1999). Acquisition of inhibitor-sensitive protein kinases through protein design. *Pharmacol Ther* 82, 337-346.
- Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., *et al.* (2000b). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* 407, 395-401.
- Blackburn, A.S., and Avery, S.V. (2003). Genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes required for antibiotic insusceptibility of eukaryotes. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 676-681.
- Bonifacio, J.S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 23-32.
- Bonilla, M., and Cunningham, K.W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 4296-4305.
- Boone, C., Sommer, S.S., Hensel, A., and Bussey, H. (1990). Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol* 110, 1833-1843.
- Bouquin, N., Johnson, A.L., Morgan, B.A., and Johnston, L.H. (1999). Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol Biol Cell* 10, 3389-3400.
- Bowers, K., and Stevens, T.H. (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1744, 438-454.
- Breeden, L., and Nasmyth, K. (1987). Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and trans-acting regulators. *Cell* 48, 389-397.
- Bridges, A.A., and Gladfelter, A.S. (2015). Septin Form and Function at the Cell Cortex. *J Biol Chem* 290, 17173-17180.
- Buehrer, B.M., and Errede, B. (1997). Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 6517-6525.
- Bulawa, C.E. (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol* 47, 505-534.
- Bulawa, C.E., and Osmond, B.C. (1990). Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7424-7428.
- Bultynck, G., Heath, V.L., Majeed, A.P., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapir, R., and Cyert, M.S. (2006). Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol Cell Biol* 26, 4729-4745.
- Cabib, E. (2004). The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Arch Biochem Biophys* 426, 201-207.
- Cabib, E., and Arroyo, J. (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat Rev Microbiol* 11, 648-655.
- Cabib, E., and Bowers, B. (1971). Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. *J Biol Chem* 246, 152-159.
- Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A., and Silverman, S.J. (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol Sci* 5, 370-375.
- Cabib, E., Drgon, T., Drgonova, J., Ford, R.A., and Kollar, R. (1997). The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem Soc Trans* 25, 200-204.
- Cabib, E., Farkas, V., Kosik, O., Blanco, N., Arroyo, J., and McPhie, P. (2008). Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 283, 29859-29872.
- Cabib, E., and Kang, M.S. (1987). Fungal 1,3-beta-glucan synthase. *Methods Enzymol* 138, 637-642.
- Cabib, E., Roh, D.H., Schmidt, M., Crotti, L.B., and Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem* 276, 19679-19682.
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B., and Silverman, S.J. (1989). Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 108, 1665-1672.
- Cabib, E., Silverman, S.J., and Shaw, J.A. (1992). Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 138, 97-102.
- Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 12, 671-682.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 237-251.

- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., and Tanner, W. (1994). Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *EMBO J* 13, 4737-4744.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.
- Cargnello, M., Tcherkezian, J., Dorn, J.F., Huttlin, E.L., Maddox, P.S., Gygi, S.P., and Roux, P.P. (2012). Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly. *Mol Cell Biol* 32, 4572-4584.
- Carlson, S.M., Chouinard, C.R., Labadorf, A., Lam, C.J., Schmelzle, K., Fraenkel, E., and White, F.M. (2011). Large-scale discovery of ERK2 substrates identifies ERK-mediated transcriptional regulation by ETV3. *Sci Signal* 4, rs11.
- Carlstrom, D. (1957). The crystal structure of alpha-chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine). *J Biophys Biochem Cytol* 3, 669-683.
- Carmody, S.R., Tran, E.J., Apponi, L.H., Corbett, A.H., and Wentz, S.R. (2010). The mitogen-activated protein kinase Slt2 regulates nuclear retention of non-heat shock mRNAs during heat shock-induced stress. *Mol Cell Biol* 30, 5168-5179.
- Carotti, C., Ragni, E., Palomares, O., Fontaine, T., Tedeschi, G., Rodríguez, R., Latge, J.P., Vai, M., and Popolo, L. (2004). Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanotransferase activity and folding. *Eur J Biochem* 271, 3635-3645.
- Carroll, A.S., Bishop, A.C., DeRisi, J.L., Shokat, K.M., and O'Shea, E.K. (2001). Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12578-12583.
- Casamayor, A., Torrance, P.D., Kobayashi, T., Thorner, J., and Alessi, D.R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* 9, 186-197.
- Cid, V.J., Adamikova, L., Sánchez, M., Molina, M., and Nombela, C. (2001). Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology* 147, 1437-1450.
- Cid, V.J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C., and Sánchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 59, 345-386.
- Claret, S., Gatti, X., Doignon, F., Thoraval, D., and Crouzet, M. (2005). The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 1375-1386.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6499-6503.
- Clotet, J., Escote, X., Adrover, M.A., Yaakov, G., Gari, E., Aldea, M., de Nadal, E., and Posas, F. (2006). Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J* 25, 2338-2346.
- Clotet, J., Gari, E., Aldea, M., and Arino, J. (1999). The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 19, 2408-2415.
- Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270, 14843-14846.
- Collister, M., Didmon, M.P., MacIsaac, F., Stark, M.J., MacDonald, N.Q., and Keyse, S.M. (2002). YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* 527, 186-192.
- Cooper, J.A. (1994). MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr Biol* 4, 1118-1121.
- Copic, A., Starr, T.L., and Schekman, R. (2007). Ent3p and Ent5p exhibit cargo-specific functions in trafficking proteins between the trans-Golgi network and the endosomes in yeast. *Mol Biol Cell* 18, 1803-1815.
- Cowan, K.J., and Storey, K.B. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* 206, 1107-1115.
- Cramer, J.F., Gustafsen, C., Behrens, M.A., Oliveira, C.L., Pedersen, J.S., Madsen, P., Petersen, C.M., and Thirup, S.S. (2010). GGA autoinhibition revisited. *Traffic* 11, 259-273.
- Cridge, A.G., Castelli, L.M., Smirnova, J.B., Selley, J.N., Rowe, W., Hubbard, S.J., McCarthy, J.E., Ashe, M.P., Grant, C.M., and Pavitt, G.D. (2010). Identifying eIF4E-binding protein translationally-

- controlled transcripts reveals links to mRNAs bound by specific PUF proteins. *Nucleic Acids Res* 38, 8039-8050.
- Cvrckova, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J.R., and Nasmyth, K. (1995). Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev* 9, 1817-1830.
 - Chapa, Y.L.B., and Ayscough, K.R. (2014). Apm4, the mu subunit of yeast AP-2 interacts with Pkc1, and mutation of the Pkc1 consensus phosphorylation site Thr176 inhibits AP-2 recruitment to endocytic sites. *Commun Integr Biol* 7, e28522.
 - Chen, P., Lee, K.S., and Levin, D.E. (1993). A pair of putative protein kinase genes (YPK1 and YPK2) is required for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 236, 443-447.
 - Chen, R.E., and Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1311-1340.
 - Chuang, J.S., and Schekman, R.W. (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* 135, 597-610.
 - Dallies, N., Francois, J., and Paquet, V. (1998). A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1297-1306.
 - Daquinag, A., Fadri, M., Jung, S.Y., Qin, J., and Kunz, J. (2007). The yeast PH domain proteins Slm1 and Slm2 are targets of sphingolipid signaling during the response to heat stress. *Mol Cell Biol* 27, 633-650.
 - Dardalhon, M., Agoutin, B., Watzinger, M., and Averbeck, D. (2009). Slt2 (Mpk1) MAP kinase is involved in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 8-methoxypsoralen plus UVA. *J Photochem Photobiol B* 95, 148-155.
 - Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E., and Gustin, M.C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* 270, 30157-30161.
 - Davies, K.J., Ermak, G., Rothermel, B.A., Pritchard, M., Heitman, J., Ahnn, J., Henrique-Silva, F., Crawford, D., Canaider, S., Strippoli, P., *et al.* (2007). Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J* 21, 3023-3028.
 - de Groot, P.W., Ruiz, C., Vázquez de Aldana, C.R., Duenas, E., Cid, V.J., Del Rey, F., Rodriguez-Peña, J.M., Pérez, P., Andel, A., Caubin, J., *et al.* (2001). A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genomics* 2, 124-142.
 - de la Cruz, J., Iost, I., Kressler, D., and Linder, P. (1997). The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5201-5206.
 - de Nadal, E., Casadome, L., and Posas, F. (2003). Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 23, 229-237.
 - de Nadal, E., and Posas, F. (2010). Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J* 29, 4-13.
 - de Nobel, H., Ruiz, C., Martín, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., and Klis, F.M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* 146 (Pt 9), 2121-2132.
 - De Virgilio, C., DeMarini, D.J., and Pringle, J.R. (1996). SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology* 142 (Pt 10), 2897-2905.
 - deHart, A.K., Schnell, J.D., Allen, D.A., and Hicke, L. (2002). The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 156, 241-248.
 - Dell'Angelica, E.C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R.C., Vargas, J.D., Hartnell, L.M., and Bonifacio, J.S. (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* 149, 81-94.
 - Delley, P.A., and Hall, M.N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* 147, 163-174.
 - DeMay, B.S., Meseroll, R.A., Occhipinti, P., and Gladfelter, A.S. (2010). Cellular requirements for the small molecule forchlorfenuron to stabilize the septin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 383-399.

- Demczuk, A., Guha, N., Nguyen, P.H., Desai, P., Chang, J., Guzinska, K., Rollins, J., Ghosh, C.C., Goodwin, L., and Vancura, A. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* phospholipase C regulates transcription of Msn2p-dependent stress-responsive genes. *Eukaryot Cell* 7, 967-979.
- Denis, V., and Cyert, M.S. (2005). Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot Cell* 4, 36-45.
- Desrivieres, S., Cooke, F.T., Parker, P.J., and Hall, M.N. (1998). MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 15787-15793.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657.
- Dijkgraaf, G.J., Abe, M., Ohya, Y., and Bussey, H. (2002). Mutations in Fks1p affect the cell wall content of beta-1,3- and beta-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19, 671-690.
- Dijkgraaf, G.J., Brown, J.L., and Bussey, H. (1996). The KNH1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of KRE9. *Yeast* 12, 683-692.
- Dobbelaere, J., and Barral, Y. (2004). Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science* 305, 393-396.
- Dobbelaere, J., Gentry, M.S., Hallberg, R.L., and Barral, Y. (2003). Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. *Dev Cell* 4, 345-357.
- Dodou, E., and Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 17, 1848-1859.
- Dong, Y., Pruyne, D., and Bretscher, A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol* 161, 1081-1092.
- Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P., and Kornfeld, S.A. (2002). Autoinhibition of the ligand-binding site of GGA1/3 VHS domains by an internal acidic cluster-dileucine motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8072-8077.
- Douglas, L.M., Alvarez, F.J., McCreary, C., and Konopka, J.B. (2005). Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. *Eukaryot Cell* 4, 1503-1512.
- Duch, A., de Nadal, E., and Posas, F. (2012). The p38 and Hog1 SAPKs control cell cycle progression in response to environmental stresses. *FEBS Lett* 586, 2925-2931.
- Dupres, V., Alsteens, D., Wilk, S., Hansen, B., Heinisch, J.J., and Dufrene, Y.F. (2009). The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nat Chem Biol* 5, 857-862.
- Dupres, V., Heinisch, J.J., and Dufrene, Y.F. (2011). Atomic force microscopy demonstrates that disulfide bridges are required for clustering of the yeast cell wall integrity sensor Wsc1. *Langmuir* 27, 15129-15134.
- Egelhofer, T.A., Villen, J., McCusker, D., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2008). The septins function in G1 pathways that influence the pattern of cell growth in budding yeast. *PLoS One* 3, e2022.
- Ekiel, I., Sulea, T., Jansen, G., Kowalik, M., Minailiuc, O., Cheng, J., Marcus, D., Cygler, M., Whiteway, M., and Wu, C. (2009). Binding the atypical RA domain of Ste50p to the unfolded Opy2p cytoplasmic tail is essential for the high-osmolarity glycerol pathway. *Mol Biol Cell* 20, 5117-5126.
- Elowitz, M., and Lim, W.A. (2010). Build life to understand it. *Nature* 468, 889-890.
- Emrick, M.A., Lee, T., Starkey, P.J., Mumby, M.C., Resing, K.A., and Ahn, N.G. (2006). The gatekeeper residue controls autoactivation of ERK2 via a pathway of intramolecular connectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18101-18106.
- Engqvist-Goldstein, A.E., Zhang, C.X., Carreno, S., Barroso, C., Heuser, J.E., and Drubin, D.G. (2004). RNAi-mediated Hip1R silencing results in stable association between the endocytic machinery and the actin assembly machinery. *Mol Biol Cell* 15, 1666-1679.
- Errede, B., Cade, R.M., Yarshar, B.M., Kamada, Y., Levin, D.E., Irie, K., and Matsumoto, K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* 42, 477-485.
- Eustice, M., and Pillus, L. (2014). Unexpected function of the glucanoyltransferase Gas1 in the DNA damage response linked to histone H3 acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 196, 1029-1039.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M., and Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276, 118-122.

- Fadri, M., Daquinag, A., Wang, S., Xue, T., and Kunz, J. (2005). The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol Biol Cell* 16, 1883-1900.
- Fang, X., Luo, J., Nishihama, R., Wloka, C., Dravis, C., Travaglia, M., Iwase, M., Vallen, E.A., and Bi, E. (2010). Biphasic targeting and cleavage furrow ingression directed by the tail of a myosin II. *J Cell Biol* 191, 1333-1350.
- Fares, H., Goetsch, L., and Pringle, J.R. (1996). Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 132, 399-411.
- Fernández-Acero, T., Rodríguez-Escudero, I., Molina, M., and Cid, V.J. (2015). The yeast cell wall integrity pathway signals from recycling endosomes upon elimination of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate by mammalian phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell Signal* 27, 2272-2284.
- Flández, M., Cosano, I.C., Nombela, C., Martín, H., and Molina, M. (2004). Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* 279, 11027-11034.
- Fleet, G.H. (1985). Composition and structure of yeast cell walls. *Curr Top Med Mycol* 1, 24-56.
- Friant, S., Lombardi, R., Schmelzle, T., Hall, M.N., and Riezman, H. (2001). Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J* 20, 6783-6792.
- Fuchs, B.B., and Mylonakis, E. (2009). Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell* 8, 1616-1625.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K., and Takai, Y. (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9, 1221-1233.
- Furukawa, K., and Hohmann, S. (2013). Synthetic biology: lessons from engineering yeast MAPK signalling pathways. *Mol Microbiol* 88, 5-19.
- Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T., and McLaughlin, S. (1989). Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). *Biochim Biophys Acta* 979, 105-112.
- García-Rodríguez, L.J., Trilla, J.A., Castro, C., Valdivieso, M.H., Duran, A., and Roncero, C. (2000). Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the fks1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 478, 84-88.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* 279, 15183-15195.
- García, G., 3rd, Bertin, A., Li, Z., Song, Y., McMurray, M.A., Thorner, J., and Nogales, E. (2011). Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J Cell Biol* 195, 993-1004.
- García, R., Botet, J., Rodríguez-Peña, J.M., Bermejo, C., Ribas, J.C., Revuelta, J.L., Nombela, C., and Arroyo, J. (2015). Genomic profiling of fungal cell wall-interfering compounds: identification of a common gene signature. *BMC Genomics* 16, 683.
- García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Bermejo, C., Nombela, C., and Arroyo, J. (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 284, 10901-10911.
- Garrenton, L.S., Stefan, C.J., McMurray, M.A., Emr, S.D., and Thorner, J. (2010). Pheromone-induced anisotropy in yeast plasma membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate distribution is required for MAPK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11805-11810.
- Geli, M.I., and Riezman, H. (1996). Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* 272, 533-535.
- Gelin-Licht, R., Paliwal, S., Conlon, P., Levchenko, A., and Gerst, J.E. (2012). Scp160-dependent mRNA trafficking mediates pheromone gradient sensing and chemotropism in yeast. *Cell Rep* 1, 483-494.
- Gelperin, D., Horton, L., DeChant, A., Hensold, J., and Lemmon, S.K. (2002). Loss of ypk1 function causes rapamycin sensitivity, inhibition of translation initiation and synthetic lethality in 14-3-3-deficient yeast. *Genetics* 161, 1453-1464.
- Ghosh, P., and Kornfeld, S. (2003). Phosphorylation-induced conformational changes regulate GGAs 1 and 3 function at the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 278, 14543-14549.
- Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.

- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- Gilden, J., and Krummel, M.F. (2010). Control of cortical rigidity by the cytoskeleton: emerging roles for septins. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 477-486.
- Gladfelter, A.S. (2010). Guides to the final frontier of the cytoskeleton: septins in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 13, 720-726.
- Goldman, R.C., Sullivan, P.A., Zakula, D., and Capobianco, J.O. (1995). Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the BGL2 gene. *Eur J Biochem* 227, 372-378.
- Gómez, A., Pérez, J., Reyes, A., Durán, A., and Roncero, C. (2009). Slt2 and Rim101 contribute independently to the correct assembly of the chitin ring at the budding yeast neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 8, 1449-1459.
- González-Novo, A., Correa-Bordes, J., Labrador, L., Sánchez, M., Vázquez de Aldana, C.R., and Jiménez, J. (2008). Sep7 is essential to modify septin ring dynamics and inhibit cell separation during *Candida albicans* hyphal growth. *Mol Biol Cell* 19, 1509-1518.
- González-Novo, A., Jiménez, J., Clotet, J., Nadal-Ribelles, M., Cavero, S., de Nadal, E., and Posas, F. (2015). Hog1 targets Whi5 and Msa1 transcription factors to downregulate cyclin expression upon stress. *Mol Cell Biol* 35, 1606-1618.
- Grava, S., Schaerer, F., Faty, M., Philippsen, P., and Barral, Y. (2006). Asymmetric recruitment of dynein to spindle poles and microtubules promotes proper spindle orientation in yeast. *Dev Cell* 10, 425-439.
- Gray, J.V., Ogas, J.P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D.E., and Herskowitz, I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J* 16, 4924-4937.
- Gruhler, A., Olsen, J.V., Mohammed, S., Mortensen, P., Faergeman, N.J., Mann, M., and Jensen, O.N. (2005). Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* 4, 310-327.
- Guan, K.L., and Dixon, J.E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* 192, 262-267.
- Haagenson, K.K., and Wu, G.S. (2010). Mitogen activated protein kinase phosphatases and cancer. *Cancer Biol Ther* 9, 337-340.
- Hahn, J.S., and Thiele, D.J. (2002). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem* 277, 21278-21284.
- Halme, A., Michelitch, M., Mitchell, E.L., and Chant, J. (1996). Bud10p directs axial cell polarization in budding yeast and resembles a transmembrane receptor. *Curr Biol* 6, 570-579.
- Han, E.S., Wu, Y., McCarter, R., Nelson, J.F., Richardson, A., and Hilsenbeck, S.G. (2004). Reproducibility, sources of variability, pooling, and sample size: important considerations for the design of high-density oligonucleotide array experiments. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59, 306-315.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9, 576-596.
- Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S., and Fesik, S.W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371, 168-170.
- Harrison, J.C., Bardes, E.S., Ohya, Y., and Lew, D.J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* 3, 417-420.
- Harrison, J.C., Zyla, T.R., Bardes, E.S., and Lew, D.J. (2004). Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J Biol Chem* 279, 2616-2622.
- Hartwell, L.H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* 69, 265-276.
- Hayashi, M., and Maeda, T. (2006). Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* 139, 797-803.
- He, B., and Guo, W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 21, 537-542.
- He, B., Xi, F., Zhang, X., Zhang, J., and Guo, W. (2007). Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J* 26, 4053-4065.
- Héctor, R.F., and Bierer, D.E. (2011). New beta-glucan inhibitors as antifungal drugs. *Expert Opin Ther Pat* 21, 1597-1610.

- Heilmann, C.J., Sorgo, A.G., Mohammadi, S., Sosinska, G.J., de Koster, C.G., Brul, S., de Koning, L.J., and Klis, F.M. (2013). Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 12, 254-264.
- Heinisch, J.J. (2005). Baker's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitors targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochim Biophys Acta* 1754, 171-182.
- Heinisch, J.J., and Dufrene, Y.F. (2010). Is there anyone out there?--Single-molecule atomic force microscopy meets yeast genetics to study sensor functions. *Integr Biol (Camb)* 2, 408-415.
- Heinisch, J.J., Dupres, V., Wilk, S., Jendretzki, A., and Dufrene, Y.F. (2010). Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS One* 5, e11104.
- Helmick, R.A., Fletcher, A.E., Gardner, A.M., Gessner, C.R., Hvitved, A.N., Gustin, M.C., and Gardner, P.R. (2005). Imidazole antibiotics inhibit the nitric oxide dioxygenase function of microbial flavohemoglobin. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1837-1843.
- Helliwell, S.B., Schmidt, A., Ohya, Y., and Hall, M.N. (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 8, 1211-1214.
- Hernández-Rodríguez, Y., and Momany, M. (2012). Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures. *Curr Opin Microbiol* 15, 660-668.
- Hertz, N.T., Wang, B.T., Allen, J.J., Zhang, C., Dar, A.C., Burlingame, A.L., and Shokat, K.M. (2010). Chemical genetic approach for kinase-substrate mapping by covalent capture of thiophosphopeptides and analysis by mass spectrometry. *Curr Protoc Chem Biol* 2, 15-36.
- Hickman, M.J., Spatt, D., and Winston, F. (2011). The Hog1 mitogen-activated protein kinase mediates a hypoxic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 188, 325-338.
- Hilioti, Z., Gallagher, D.A., Low-Nam, S.T., Ramaswamy, P., Gajer, P., Kingsbury, T.J., Birchwood, C.J., Levchenko, A., and Cunningham, K.W. (2004). GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev* 18, 35-47.
- Hirschmann, W.D., Westendorf, H., Mayer, A., Cannarozzi, G., Cramer, P., and Jansen, R.P. (2014). Scp160p is required for translational efficiency of codon-optimized mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res* 42, 4043-4055.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 300-372.
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 583, 4025-4029.
- Holly, S.P., and Blumer, K.J. (1999). PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 147, 845-856.
- Homma, K., Terui, S., Minemura, M., Qadota, H., Anraku, Y., Kanaho, Y., and Ohya, Y. (1998). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J Biol Chem* 273, 15779-15786.
- Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., and Saito, H. (2008). Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Mol Cell Biol* 28, 5172-5183.
- Hosotani, T., Koyama, H., Uchino, M., Miyakawa, T., and Tsuchiya, E. (2001). PKC1, a protein kinase C homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, participates in microtubule function through the yeast EB1 homologue, BIM1. *Genes Cells* 6, 775-788.
- Hruby, A., Zapatka, M., Heucke, S., Rieger, L., Wu, Y., Nussbaumer, U., Timmermann, S., Dunkler, A., and Johnsson, N. (2011). A constraint network of interactions: protein-protein interaction analysis of the yeast type II phosphatase Ptc1p and its adaptor protein Nbp2p. *J Cell Sci* 124, 35-46.
- Hunter, T., and Plowman, G.D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 22, 18-22.
- Hutchins, K., and Bussey, H. (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol* 154, 161-169.
- Hutzler, F., Gerstl, R., Lommel, M., and Strahl, S. (2008). Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Mol Microbiol* 68, 1438-1449.
- Ibarra, A. (2013). Expresión en *S. cerevisiae* de una versión de la MAPK Slt2 capaz de utilizar análogos de ATP. Trabajo fin de Máster.

- Igual, J.C., Johnson, A.L., and Johnston, L.H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J* 15, 5001-5013.
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M.N., and Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol* 19, 8344-8352.
- Inoue, S.B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T., and Ohya, Y. (1999). Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1, 3-beta-glucan synthase. *J Biol Chem* 274, 38119-38124.
- Inoue, S.B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., and Watanabe, T. (1995). Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 231, 845-854.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K.S., Levin, D.E., Araki, H., Matsumoto, K., and Oshima, Y. (1993). MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 13, 3076-3083.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.
- Ito, T., Chiba, T., and Yoshida, M. (2001). Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects. *Trends Biotechnol* 19, S23-27.
- Iwase, M., Luo, J., Nagaraj, S., Longtine, M., Kim, H.B., Haarer, B.K., Caruso, C., Tong, Z., Pringle, J.R., and Bi, E. (2006). Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Mol Biol Cell* 17, 1110-1125.
- Iyer, V.R., Horak, C.E., Scafe, C.S., Botstein, D., Snyder, M., and Brown, P.O. (2001). Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* 409, 533-538.
- Jacoby, J.J., Nilius, S.M., and Heinisch, J.J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Gen Genet* 258, 148-155.
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A., and Heinisch, J.J. (2011). How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur J Cell Biol* 90, 740-744.
- Jiang, L., Cao, C., Zhang, L., Lin, W., Xia, J., Xu, H., and Zhang, Y. (2014). Cadmium-induced activation of high osmolarity glycerol pathway through its Sln1 branch is dependent on the MAP kinase kinase kinase Ssk2, but not its paralog Ssk22, in budding yeast. *FEMS Yeast Res* 14, 1263-1272.
- Jiménez-Sánchez, M., Cid, V.J., and Molina, M. (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* 282, 31174-31185.
- Jiménez, J., Cid, V.J., Cenamor, R., Yuste, M., Molero, G., Nombela, C., and Sánchez, M. (1998). Morphogenesis beyond cytokinetic arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 143, 1617-1634.
- Jimeno, S., Tous, C., García-Rubio, M.L., Ranes, M., González-Aguilera, C., Marín, A., and Aguilera, A. (2011). New suppressors of THO mutations identify Thp3 (Ypr045c)-Csn12 as a protein complex involved in transcription elongation. *Mol Cell Biol* 31, 674-685.
- Jin, C., Parshin, A.V., Daly, I., Strich, R., and Cooper, K.F. (2013). The cell wall sensors Mtl1, Wsc1, and Mid2 are required for stress-induced nuclear to cytoplasmic translocation of cyclin C and programmed cell death in yeast. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 320823.
- Jin, C., Strich, R., and Cooper, K.F. (2014). Slt2p phosphorylation induces cyclin C nuclear-to-cytoplasmic translocation in response to oxidative stress. *Mol Biol Cell* 25, 1396-1407.
- Johnson, E.S., and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147, 981-994.
- Johnson, J.M., Jin, M., and Lew, D.J. (2011). Symmetry breaking and the establishment of cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* 21, 740-746.
- Jost, M., Simpson, F., Kavran, J.M., Lemmon, M.A., and Schmid, S.L. (1998). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol* 8, 1399-1402.
- Jung, U.S., and Levin, D.E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* 34, 1049-1057.
- Jung, U.S., Sobering, A.K., Romeo, M.J., and Levin, D.E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* 46, 781-789.
- Ka, M., Park, Y.U., and Kim, J. (2008). The DEAD-box RNA helicase, Dhh1, functions in mating by regulating Ste12 translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 680-686.

- Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., and Ohsumi, Y. (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* 25, 7239-7248.
- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., and Levin, D.E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9, 1559-1571.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y., and Levin, D.E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem* 271, 9193-9196.
- Kapteyn, J.C., Ram, A.F., Groos, E.M., Kollar, R., Montijn, R.C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E., and Klis, F.M. (1997). Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol* 179, 6279-6284.
- Kapteyn, J.C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H., and Klis, F.M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* 39, 469-479.
- Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H., and Klis, F.M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* 1426, 373-383.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* 181, 3330-3340.
- Khalfan, W., Ivanovska, I., and Rose, M.D. (2000). Functional interaction between the PKC1 pathway and CDC31 network of SPB duplication genes. *Genetics* 155, 1543-1559.
- Kiel, C., Yus, E., and Serrano, L. (2010). Engineering signal transduction pathways. *Cell* 140, 33-47.
- Kim, K.Y., and Levin, D.E. (2010). Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast* 27, 541-548.
- Kim, K.Y., and Levin, D.E. (2011). Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination. *Cell* 144, 745-756.
- Kim, K.Y., Truman, A.W., and Levin, D.E. (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol* 28, 2579-2589.
- King, C.C., Gardiner, E.M., Zenke, F.T., Bohl, B.P., Newton, A.C., Hemmings, B.A., and Bokoch, G.M. (2000). p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem* 275, 41201-41209.
- Kingsbury, T.J., and Cunningham, K.W. (2000). A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 14, 1595-1604.
- Klebl, F., and Tanner, W. (1989). Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171, 6259-6264.
- Klein, M., Morillas, M., Vendrell, A., Brive, L., Gebbia, M., Wallace, I.M., Giaever, G., Nislow, C., Posas, F., and Grotli, M. (2011). Design, synthesis and characterization of a highly effective inhibitor for analog-sensitive (as) kinases. *PLoS One* 6, e20789.
- Klis, F.M., Boorsma, A., and De Groot, P.W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202.
- Kock, C., Dufrene, Y.F., and Heinisch, J.J. (2015). Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Appl Environ Microbiol* 81, 806-811.
- Koch, A., and Hauf, S. (2010). Strategies for the identification of kinase substrates using analog-sensitive kinases. *Eur J Cell Biol* 89, 184-193.
- Koch, M.R., and Pillus, L. (2009). The glucanoyltransferase Gas1 functions in transcriptional silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11224-11229.
- Kohno, H., Tanaka, K., Mino, A., Umikawa, M., Imamura, H., Fujiwara, T., Fujita, Y., Hotta, K., Qadota, H., Watanabe, T., *et al.* (1996). Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15, 6060-6068.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., and Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* 272, 17762-17775.
- Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* 131, 557-571.

- Kono, K., Nogami, S., Abe, M., Nishizawa, M., Morishita, S., Pellman, D., and Ohya, Y. (2008). G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 19, 1763-1771.
- Krause, S.A., and Gray, J.V. (2002). The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12, 588-593.
- Krems, B., Charizanis, C., and Entian, K.D. (1996). The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet* 29, 327-334.
- Kubler, E., and Riezman, H. (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J* 12, 2855-2862.
- Kusch, J., Meyer, A., Snyder, M.P., and Barral, Y. (2002). Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. *Genes Dev* 16, 1627-1639.
- Kutateladze, T.G. (2010). Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol* 6, 507-513.
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodríguez, C., Martín-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J.D., and Francois, J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 20345-20357.
- Lam, M.H., Snider, J., Rehal, M., Wong, V., Aboulizadeh, F., Drecun, L., Wong, O., Jubran, B., Li, M., Ali, M., *et al.* (2015). A Comprehensive Membrane Interactome Mapping of Sho1p Reveals Fps1p as a Novel Key Player in the Regulation of the HOG Pathway in *S. cerevisiae*. *J Mol Biol* 427, 2088-2103.
- Lardenois, A., Stuparevic, I., Liu, Y., Law, M.J., Becker, E., Smagulova, F., Waern, K., Guilleux, M.H., Horecka, J., Chu, A., *et al.* (2015). The conserved histone deacetylase Rpd3 and its DNA binding subunit Ume6 control dynamic transcript architecture during mitotic growth and meiotic development. *Nucleic Acids Res* 43, 115-128.
- Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K., and Levin, D.E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 13, 3067-3075.
- Lee, K.S., and Levin, D.E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* 12, 172-182.
- Lemmon, M.A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 99-111.
- Leng, G., and Song, K. (2016). Direct interaction of Ste11 and Mkk1/2 through Nst1 integrates high-osmolarity glycerol and pheromone pathways to the cell wall integrity MAPK pathway. *FEBS Lett* 590, 148-160.
- Lesage, G., and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 317-343.
- Lesage, G., Sdicu, A.M., Menard, P., Shapiro, J., Hussein, S., and Bussey, H. (2004). Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* 167, 35-49.
- Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189, 1145-1175.
- Levin, D.E., Bowers, B., Chen, C.Y., Kamada, Y., and Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 40, 229-239.
- Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M., and Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62, 213-224.
- Li, S., Dean, S., Li, Z., Horecka, J., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (2002). The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor, Skn7p. *Mol Biol Cell* 13, 412-424.
- Lillie, S.H., and Brown, S.S. (1994). Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 125, 825-842.
- Lin, T.A., Kong, X., Haystead, T.A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., and Lawrence, J.C., Jr. (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 266, 653-656.
- Lipke, P.N., and Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* 180, 3735-3740.

- Lippincott, J., and Li, R. (1998). Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J Cell Biol* 140, 355-366.
- Lippincott, J., Shannon, K.B., Shou, W., Deshaies, R.J., and Li, R. (2001). The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. *J Cell Sci* 114, 1379-1386.
- Liu, K., Zhang, X., Lester, R.L., and Dickson, R.C. (2005). The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J Biol Chem* 280, 22679-22687.
- Liu, S., Hou, Y., Liu, W., Lu, C., Wang, W., and Sun, S. (2015). Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryot Cell* 14, 324-334.
- Liu, S., and Storrie, B. (2012). Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cell Mol Life Sci* 69, 4093-4106.
- Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, D.O., and Shokat, K.M. (1999). Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol* 6, 671-678.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lo, H.C., and Hollingsworth, N.M. (2011). Using the semi-synthetic epitope system to identify direct substrates of the meiosis-specific budding yeast kinase, Mek1. *Methods Mol Biol* 745, 135-149.
- Lodhi, S., Weiner, N.D., and Schacht, J. (1979). Interactions of neomycin with monomolecular films of polyphosphoinositides and other lipids. *Biochim Biophys Acta* 557, 1-8.
- Loebrich, S. (2014). The role of F-actin in modulating Clathrin-mediated endocytosis: Lessons from neurons in health and neuropsychiatric disorder. *Commun Integr Biol* 7, e28740.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wulschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10, 457-468.
- Loibl, M., and Strahl, S. (2013). Protein O-mannosylation: what we have learned from baker's yeast. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2438-2446.
- Longtine, M.S., and Bi, E. (2003). Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol* 13, 403-409.
- Longtine, M.S., DeMarini, D.J., Valencik, M.L., Al-Awar, O.S., Fares, H., De Virgilio, C., and Pringle, J.R. (1996). The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* 8, 106-119.
- Longtine, M.S., Fares, H., and Pringle, J.R. (1998). Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J Cell Biol* 143, 719-736.
- Longtine, M.S., Theesfeld, C.L., McMillan, J.N., Weaver, E., Pringle, J.R., and Lew, D.J. (2000). Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 4049-4061.
- Lorberg, A., Jacoby, J.J., Schmitz, H.P., and Heinisch, J.J. (2001). The PH domain of the yeast GEF Rom2p serves an essential function in vivo. *Mol Genet Genomics* 266, 505-513.
- Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O.N., and Dickson, R.C. (2008). The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *J Biol Chem* 283, 10433-10444.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Winnett, E., Vo, D.H., Sheraton, J., Dusterhoft, A., Storms, R.K., and Bussey, H. (1997). Completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence allows identification of KTR5, KTR6 and KTR7 and definition of the nine-membered KRE2/MNT1 mannosyltransferase gene family in this organism. *Yeast* 13, 267-274.
- Macía, J., Regot, S., Peeters, T., Conde, N., Sole, R., and Posas, F. (2009). Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Sci Signal* 2, ra13.
- Madden, K., Sheu, Y.J., Baetz, K., Andrews, B., and Snyder, M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* 275, 1781-1784.
- Maeda, T., Takekawa, M., and Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269, 554-558.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242-245.
- Mager, W.H., and Winderickx, J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci* 26, 265-273.

- Malleshaiah, M.K., Shahrezaei, V., Swain, P.S., and Michnick, S.W. (2010). The scaffold protein Ste5 directly controls a switch-like mating decision in yeast. *Nature* 465, 101-105.
- Manjithaya, R., Jain, S., Farre, J.C., and Subramani, S. (2010). A yeast MAPK cascade regulates pexophagy but not other autophagy pathways. *J Cell Biol* 189, 303-310.
- Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C., Bjorndal, H., and Lindberg, B. (1973). The structure of a beta-(1-6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J* 135, 31-36.
- Mao, K., and Klionsky, D.J. (2011). MAPKs regulate mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 7, 1564-1565.
- Marín, M.J., Flández, M., Bermejo, C., Arroyo, J., Martín, H., and Molina, M. (2009). Different modulation of the outputs of yeast MAPK-mediated pathways by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5. *Mol Genet Genomics* 281, 345-359.
- Marsellach, F.X., Huertas, D., and Azorin, F. (2006). The multi-KH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae* Scp160p contributes to the regulation of telomeric silencing. *J Biol Chem* 281, 18227-18235.
- Marshall, C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 4, 82-89.
- Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M., and Nombela, C. (1993). Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol Gen Genet* 241, 177-184.
- Martín, H., Flández, M., Nombela, C., and Molina, M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* 58, 6-16.
- Martín, H., Mendoza, A., Rodríguez-Pachón, J.M., Molina, M., and Nombela, C. (1997). Characterization of SKM1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a novel Ste20/PAK-like protein kinase. *Mol Microbiol* 23, 431-444.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. (2000). Regulatory Mechanisms for Modulation of Signaling through the Cell Integrity Slt2-mediated Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 1511-1519.
- Martín, H., Shales, M., Fernández-Piñar, P., Wei, P., Molina, M., Fiedler, D., Shokat, K.M., Beltrao, P., Lim, W., and Krogan, N.J. (2015). Differential genetic interactions of yeast stress response MAPK pathways. *Mol Syst Biol* 11, 800.
- Mas, G., de Nadal, E., Dechant, R., Rodríguez de la Concepcion, M.L., Logie, C., Jimeno-González, S., Chávez, S., Ammerer, G., and Posas, F. (2009). Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J* 28, 326-336.
- Mascaraque, V., Hernaez, M.L., Jiménez-Sánchez, M., Hansen, R., Gil, C., Martín, H., Cid, V.J., and Molina, M. (2013). Phosphoproteomic analysis of protein kinase C signaling in *Saccharomyces cerevisiae* reveals Slt2 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent phosphorylation of eisosome core components. *Mol Cell Proteomics* 12, 557-574.
- Mattison, C.P., Spencer, S.S., Kresge, K.A., Lee, J., and Ota, I.M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol Cell Biol* 19, 7651-7660.
- Mayer, A., Scheglmann, D., Dove, S., Glatz, A., Wickner, W., and Haas, A. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates two steps of homotypic vacuole fusion. *Mol Biol Cell* 11, 807-817.
- Mayinger, P. (2012). Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1821, 1104-1113.
- Mazan, M., Ragni, E., Popolo, L., and Farkas, V. (2011). Catalytic properties of the Gas family beta-(1,3)-glucanotransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. *Biochem J* 438, 275-282.
- Mazur, P., and Baginsky, W. (1996). In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J Biol Chem* 271, 14604-14609.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B., and Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* 15, 5671-5681.
- McCrea, H.J., and De Camilli, P. (2009). Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. *Physiology (Bethesda)* 24, 8-16.
- McKay, M.M., and Kahn, R.A. (2004). Multiple phosphorylation events regulate the subcellular localization of GGA1. *Traffic* 5, 102-116.

- McMurray, M.A., Bertín, A., García, G., 3rd, Lam, L., Nogales, E., and Thorner, J. (2011). Septin filament formation is essential in budding yeast. *Dev Cell* 20, 540-549.
- McMurray, M.A., and Thorner, J. (2009). Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Div* 4, 18.
- Mehta, S., Li, H., Hogan, P.G., and Cunningham, K.W. (2009). Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast. *Mol Cell Biol* 29, 2777-2793.
- Merlini, L., Bolognesi, A., Juanes, M.A., Vandermoere, F., Courtellemont, T., Pascolutti, R., Seveno, M., Barral, Y., and Piatti, S. (2015). Rho1- and Pkc1-dependent phosphorylation of the F-BAR protein Syp1 contributes to septin ring assembly. *Mol Biol Cell* 26, 3245-3262.
- Merlini, L., and Piatti, S. (2011). The mother-bud neck as a signaling platform for the coordination between spindle position and cytokinesis in budding yeast. *Biol Chem* 392, 805-812.
- Miller, C., Schwalb, B., Maier, K., Schulz, D., Dumcke, S., Zacher, B., Mayer, A., Sydow, J., Marcinowski, L., Dolken, L., *et al.* (2011). Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Mol Syst Biol* 7, 458.
- Miller, G.J., Mattera, R., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2003). Recognition of accessory protein motifs by the gamma-adaptin ear domain of GGA3. *Nat Struct Biol* 10, 599-606.
- Millson, S.H., Truman, A.W., King, V., Prodromou, C., Pearl, L.H., and Piper, P.W. (2005). A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slt2p (Mpk1p). *Eukaryot Cell* 4, 849-860.
- Minke, R., and Blackwell, J. (1978). The structure of alpha-chitin. *J Mol Biol* 120, 167-181.
- Mirón-García, M.C., Garrido-Godino, A.I., Martínez-Fernández, V., Fernández-Pevida, A., Cuevas-Bermúdez, A., Martín-Exposito, M., Chávez, S., de la Cruz, J., and Navarro, F. (2014). The yeast prefoldin-like URI-orthologue Bud27 associates with the RSC nucleosome remodeler and modulates transcription. *Nucleic Acids Res* 42, 9666-9676.
- Mitchell, D.A., Marshall, T.K., and Deschenes, R.J. (1993). Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9, 715-722.
- Mitchell, L., Lau, A., Lambert, J.P., Zhou, H., Fong, Y., Couture, J.F., Figeys, D., and Baetz, K. (2011). Regulation of septin dynamics by the *Saccharomyces cerevisiae* lysine acetyltransferase NuA4. *PLoS One* 6, e25336.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., and Novick, P. (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* 81, 637-659.
- Mok, J., Kim, P.M., Lam, H.Y., Piccirillo, S., Zhou, X., Jeschke, G.R., Sheridan, D.L., Parker, S.A., Desai, V., Jwa, M., *et al.* (2010). Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *Sci Signal* 3, ra12.
- Molin, C., Jauhainen, A., Warringer, J., Nerman, O., and Sunnerhagen, P. (2009). mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress. *RNA* 15, 600-614.
- Molina, M., Cid, V.J., and Martín, H. (2010). Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast* 27, 503-511.
- Molina, M., Gil, C., Pla, J., Arroyo, J., and Nombela, C. (2000). Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc Res Tech* 51, 601-612.
- Mollapour, M., and Piper, P.W. (2006). Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6, 1274-1280.
- Mollapour, M., and Piper, P.W. (2007). Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol Cell Biol* 27, 6446-6456.
- Montijn, R.C., Vink, E., Muller, W.H., Verkleij, A.J., Van Den Ende, H., Henrissat, B., and Klis, F.M. (1999). Localization of synthesis of beta1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 7414-7420.
- Moravcevic, K., Oxley, C.L., and Lemmon, M.A. (2012). Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity. *Structure* 20, 15-27.
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., and De Virgilio, C. (2015). TORC1 controls G1-S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat Commun* 6, 8256.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25, 635-646.

- Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S., and Johnston, L.H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 16, 1035-1044.
- Mortensen, E.M., McDonald, H., Yates, J., 3rd, and Kellogg, D.R. (2002). Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex. *Mol Biol Cell* 13, 2091-2105.
- Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 183-194.
- Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B., and Latge, J.P. (2000). Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1-3)glucanotransferases identified in fungi. *Biochem J* 347 Pt 3, 741-747.
- Mullins, C., and Bonifacio, J.S. (2001). Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, alpha-factor maturation, and interactions with clathrin. *Mol Cell Biol* 21, 7981-7994.
- Nagahashi, S., Lussier, M., and Bussey, H. (1998). Isolation of *Candida glabrata* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* KRE9 and KNH1 genes and their involvement in cell wall beta-1,6-glucan synthesis. *J Bacteriol* 180, 5020-5029.
- Nasmyth, K., and Dirick, L. (1991). The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* 66, 995-1013.
- Nguyen, T.H., Fleet, G.H., and Rogers, P.L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol* 50, 206-212.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14, 5931-5938.
- Nuñez, L.R., Jesch, S.A., Gaspar, M.L., Almaguer, C., Villa-García, M., Ruiz-Noriega, M., Patton-Vogt, J., and Henry, S.A. (2008). Cell wall integrity MAPK pathway is essential for lipid homeostasis. *J Biol Chem* 283, 34204-34217.
- O'Rourke, S.M., and Herskowitz, I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 12, 2874-2886.
- O'Rourke, S.M., and Herskowitz, I. (2002). A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol* 22, 4739-4749.
- Oh, Y., and Bi, E. (2011). Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol* 21, 141-148.
- Okada, H., Abe, M., Asakawa-Minemura, M., Hirata, A., Qadota, H., Morishita, K., Ohnuki, S., Nogami, S., and Ohya, Y. (2010). Multiple functional domains of the yeast 1,3-beta-glucan synthase subunit Fks1p revealed by quantitative phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants. *Genetics* 184, 1013-1024.
- Omura, S., Sasaki, Y., Iwai, Y., and Takeshima, H. (1995). Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J Antibiot (Tokyo)* 48, 535-548.
- Ong, K., Wloka, C., Okada, S., Svitkina, T., and Bi, E. (2014). Architecture and dynamic remodelling of the septin cytoskeleton during the cell cycle. *Nat Commun* 5, 5698.
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* 192, 775-818.
- Ota, I.M., and Mapes, J. (2007). Targeting of PP2C in budding yeast. *Methods Mol Biol* 365, 309-322.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., and Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15, 2196-2207.
- Paczkowski, J.E., Richardson, B.C., and Fromme, J.C. (2015). Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol* 25, 408-416.
- Page, N., Gerard-Vincent, M., Menard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G.J., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., Dowse, T., et al. (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics* 163, 875-894.
- Panadero, J., Pallotti, C., Rodríguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., and Prieto, J.A. (2006). A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281, 4638-4645.

- Paravicini, G., and Friedli, L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol Gen Genet* 251, 682-691.
- Park, H.O., and Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 48-96.
- Park, Y.U., Hur, H., Ka, M., and Kim, J. (2006). Identification of translational regulation target genes during filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*: regulatory role of Caf20 and Dhh1. *Eukaryot Cell* 5, 2120-2127.
- Patasi, C., Godocikova, J., Michlikova, S., Nie, Y., Kacerikova, R., Kvalova, K., Raunser, S., and Farkasovsky, M. (2015). The role of Bni5 in the regulation of septin higher-order structure formation. *Biol Chem* 396, 1325-1337.
- Pérez, P., and Rincón, S.A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* 426, 243-253.
- Petkova, M.I., Pujol-Carrion, N., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2012). Mtl1 O-mannosylation mediated by both Pmt1 and Pmt2 is important for cell survival under oxidative conditions and TOR blockade. *Fungal Genet Biol* 49, 903-914.
- Pfaller, M., and Riley, J. (1992). Effects of fluconazole on the sterol and carbohydrate composition of four species of *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11, 152-156.
- Philip, B., and Levin, D.E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* 21, 271-280.
- Popolo, L., Cavadini, P., Vai, M., and Alberghina, L. (1993). Transcript accumulation of the GGP1 gene, encoding a yeast GPI-anchored glycoprotein, is inhibited during arrest in the G1 phase and during sporulation. *Curr Genet* 24, 382-387.
- Popolo, L., Gualtieri, T., and Ragni, E. (2001). The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 111-121.
- Popolo, L., and Vai, M. (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* 1426, 385-400.
- Posas, F., and Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276, 1702-1705.
- Posas, F., and Saito, H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* 17, 1385-1394.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 86, 865-875.
- Proft, M., Mas, G., de Nadal, E., Vendrell, A., Noriega, N., Struhl, K., and Posas, F. (2006). The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol Cell* 23, 241-250.
- Prosser, D.C., Drivas, T.G., Maldonado-Baez, L., and Wendland, B. (2011). Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J Cell Biol* 195, 657-671.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* 113 (Pt 4), 571-585.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., and Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* 272, 279-281.
- Qi, M., and Elion, E.A. (2005). MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 118, 3569-3572.
- Queralt, E., and Igual, J.C. (2005). Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171, 1485-1498.
- Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latge, J.P., and Popolo, L. (2007). The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* 24, 297-308.
- Raitt, D.C., Johnson, A.L., Erkin, A.M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D.S., and Johnston, L.H. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 11, 2335-2347.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B., and Levin, D.E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 3969-3976.
- Ram, A.F., Brekelmans, S.S., Oehlen, L.J., and Klis, F.M. (1995). Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 358, 165-170.

- Ram, A.F., and Klis, F.M. (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat Protoc* 1, 2253-2256.
- Ramezani-Rad, M. (2003). The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr Genet* 43, 161-170.
- Ray, A., Héctor, R.E., Roy, N., Song, J.H., Berkner, K.L., and Runge, K.W. (2003). Sir3p phosphorylation by the Slt2p pathway effects redistribution of silencing function and shortened lifespan. *Nat Genet* 33, 522-526.
- Reinoso-Martín, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., and Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* 2, 1200-1210.
- Reiser, V., Raitt, D.C., and Saito, H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* 161, 1035-1040.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G., and Ruis, H. (1999). Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol* 19, 5474-5485.
- Richter, J.D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477-480.
- Roberts, C.J., Raymond, C.K., Yamashiro, C.T., and Stevens, T.H. (1991). Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol* 194, 644-661.
- Roberts, R.L., Bowers, B., Slater, M.L., and Cabib, E. (1983). Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 3, 922-930.
- Rodríguez-Peña, J.M., Cid, V.J., Arroyo, J., and Nombela, C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol* 20, 3245-3255.
- Rodríguez-Peña, J.M., Díez-Muñiz, S., Bermejo, C., Nombela, C., and Arroyo, J. (2013). Activation of the yeast cell wall integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2. *FEBS Lett* 587, 3675-3680.
- Roelants, F.M., Torrance, P.D., Bezman, N., and Thorner, J. (2002). Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol Biol Cell* 13, 3005-3028.
- Roemer, T., Delaney, S., and Bussey, H. (1993). SKN1 and KRE6 define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in beta-glucan synthesis. *Mol Cell Biol* 13, 4039-4048.
- Roemer, T., Madden, K., Chang, J., and Snyder, M. (1996). Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev* 10, 777-793.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A., and Bussey, H. (1994). Characterization of the yeast (1→6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol* 127, 567-579.
- Roh, D.H., Bowers, B., Schmidt, M., and Cabib, E. (2002). The septation apparatus, an autonomous system in budding yeast. *Mol Biol Cell* 13, 2747-2759.
- Rolli, E., Ragni, E., Calderon, J., Porello, S., Fascio, U., and Popolo, L. (2009). Immobilization of the glycosylphosphatidylinositol-anchored Gas1 protein into the chitin ring and septum is required for proper morphogenesis in yeast. *Mol Biol Cell* 20, 4856-4870.
- Rolli, E., Ragni, E., de Medina-Redondo, M., Arroyo, J., de Aldana, C.R., and Popolo, L. (2011). Expression, stability, and replacement of glucan-remodeling enzymes during developmental transitions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 22, 1585-1598.
- Rolli, E., Ragni, E., Rodríguez-Peña, J.M., Arroyo, J., and Popolo, L. (2010). GAS3, a developmentally regulated gene, encodes a highly mannosylated and inactive protein of the Gas family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27, 597-610.
- Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Pérez-Ortín, J.E., and Alepuz, P. (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 15, 1110-1120.
- Roumanie, O., Wu, H., Molk, J.N., Rossi, G., Bloom, K., and Brennwald, P. (2005). Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex. *J Cell Biol* 170, 583-594.
- Ruiz-Herrera, J. (1991). Biosynthesis of beta-glucans in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 60, 72-81.
- Ruiz-Herrera, J., and Martínez-Espinoza, A.D. (1999). Chitin biosynthesis and structural organization in vivo. *EXS* 87, 39-53.

- Saeed, A.I., Bhagabati, N.K., Braisted, J.C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E.A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J.A., and Quackenbush, J. (2006). TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 411, 134-193.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., *et al.* (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374-378.
- Saito, H., and Tatebayashi, K. (2004). Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem* 136, 267-272.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanders, S.L., and Herskowitz, I. (1996). The BUD4 protein of yeast, required for axial budding, is localized to the mother/BUD neck in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Biol* 134, 413-427.
- Sanz, A.B., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Díez-Muñoz, S., Nombela, C., Peterson, C.L., and Arroyo, J. (2012). Chromatin remodeling by the SWI/SNF complex is essential for transcription mediated by the yeast cell wall integrity MAPK pathway. *Mol Biol Cell* 23, 2805-2817.
- Scrimale, T., Didone, L., de Mesy Bentley, K.L., and Krysan, D.J. (2009). The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 20, 164-175.
- Schacht, J. (1976). Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J Neurochem* 27, 1119-1124.
- Schacht, J. (1978). Purification of polyphosphoinositides by chromatography on immobilized neomycin. *J Lipid Res* 19, 1063-1067.
- Schmelzle, T., Helliwell, S.B., and Hall, M.N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol* 22, 1329-1339.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., and Hall, M.N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531-542.
- Schmitz, H.P., Lorberg, A., and Heinisch, J.J. (2002). Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol Microbiol* 44, 829-840.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6, 209-217.
- Schott, D., Huffaker, T., and Bretscher, A. (2002). Microfilaments and microtubules: the news from yeast. *Curr Opin Microbiol* 5, 564-574.
- Schuldiner, M., Collins, S.R., Thompson, N.J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J.F., *et al.* (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507-519.
- Sengupta, D., and Linstedt, A.D. (2011). Control of organelle size: the Golgi complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 57-77.
- Serrano, R., Martín, H., Casamayor, A., and Arino, J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Sit2 MAPK pathway. *J Biol Chem* 281, 39785-39795.
- Shahinian, S., and Bussey, H. (2000). beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 35, 477-489.
- Shankarnarayan, S., Malone, C.L., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (2008). Modulation of yeast Sln1 kinase activity by the CCW12 cell wall protein. *J Biol Chem* 283, 1962-1973.
- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Durán, A., and Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* 114, 111-123.
- Shaw, J.D., Cummings, K.B., Hoyer, G., Michaelis, S., and Wendland, B. (2001). Yeast as a model system for studying endocytosis. *Exp Cell Res* 271, 1-9.
- Sheu, Y.J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., and Snyder, M. (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 4053-4069.
- Shih, J.L., Reck-Peterson, S.L., Newitt, R., Mooseker, M.S., Aebersold, R., and Herskowitz, I. (2005). Cell polarity protein Spa2P associates with proteins involved in actin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16, 4595-4608.

- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Silverman, S.J., Sburlati, A., Slater, M.L., and Cabib, E. (1988). Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4735-4739.
- Simpson-Lavy, K.J., Sajman, J., Zenvirth, D., and Brandeis, M. (2009). APC/CCdh1 specific degradation of Hsl1 and Clb2 is required for proper stress responses of *S. cerevisiae*. *Cell Cycle* 8, 3003-3009.
- Slaughter, B.D., Smith, S.E., and Li, R. (2009). Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003384.
- Smaczynska-de, R., Il, Costa, R., and Ayscough, K.R. (2008). Yeast Arf3p modulates plasma membrane PtdIns(4,5)P2 levels to facilitate endocytosis. *Traffic* 9, 559-573.
- Smits, G.J., Kapteyn, J.C., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2, 348-352.
- Smits, G.J., van den Ende, H., and Klis, F.M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* 147, 781-794.
- Soler, M., Plovins, A., Martín, H., Molina, M., and Nombela, C. (1995). Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol Microbiol* 17, 833-842.
- Sorgo, A.G., Heilmann, C.J., Dekker, H.L., Bekker, M., Brul, S., de Koster, C.G., de Koning, L.J., and Klis, F.M. (2011). Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 10, 1071-1081.
- Soriano-Carot, M., Quilis, I., Bano, M.C., and Igual, J.C. (2014). Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res* 42, 7084-7095.
- Sotelo, J., and Rodríguez-Gabriel, M.A. (2006). Mitogen-activated protein kinase Hog1 is essential for the response to arsenite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 5, 1826-1830.
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schutz, F., Jenö, P., and Hall, M.N. (2010). The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell* 21, 3475-3486.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 9, 3273-3297.
- Staleva, L., Hall, A., and Orlow, S.J. (2004). Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent manner. *Mol Biol Cell* 15, 5574-5582.
- Stanger, K., Gorelik, M., and Davidson, A.R. (2012). Yeast adaptor protein, Nbp2p, is conserved regulator of fungal Ptc1p phosphatases and is involved in multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 287, 22133-22141.
- Stathopoulos, A.M., and Cyert, M.S. (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* 11, 3432-3444.
- Stefan, C.J., Padilla, S.M., Audhya, A., and Emr, S.D. (2005). The phosphoinositide phosphatase Sjl2 is recruited to cortical actin patches in the control of vesicle formation and fission during endocytosis. *Mol Cell Biol* 25, 2910-2923.
- Stolz, L.E., Kuo, W.J., Longchamps, J., Sekhon, M.K., and York, J.D. (1998). INP51, a yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase required for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis and whose absence confers a cold-resistant phenotype. *J Biol Chem* 273, 11852-11861.
- Straede, A., and Heinisch, J.J. (2007). Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS Lett* 581, 4495-4500.
- Sucher, A.J., Chahine, E.B., and Balcer, H.E. (2009). Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother* 43, 1647-1657.
- Sun, Y., Carroll, S., Kaksonen, M., Toshima, J.Y., and Drubin, D.G. (2007). PtdIns(4,5)P2 turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization. *J Cell Biol* 177, 355-367.
- Sun, Y., Kaksonen, M., Madden, D.T., Schekman, R., and Drubin, D.G. (2005). Interaction of Sla2p's ANTH domain with PtdIns(4,5)P2 is important for actin-dependent endocytic internalization. *Mol Biol Cell* 16, 717-730.
- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J., and Villen, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* 10, 676-682.

- Taba, M.R., Muroff, I., Lydall, D., Tebb, G., and Nasmyth, K. (1991). Changes in a SWI4,6-DNA-binding complex occur at the time of HO gene activation in yeast. *Genes Dev* 5, 2000-2013.
- Takahashi, Y., Iwase, M., Konishi, M., Tanaka, M., Toh-e, A., and Kikuchi, Y. (1999). Smt3, a SUMO-1 homolog, is conjugated to Cdc3, a component of septin rings at the mother-bud neck in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 582-587.
- Tamas, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C., Hernández, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J., *et al.* (1999). Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol* 31, 1087-1104.
- Tang, C.S., and Reed, S.I. (2002). Phosphorylation of the septin cdc3 in g1 by the cdc28 kinase is essential for efficient septin ring disassembly. *Cell Cycle* 1, 42-49.
- Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2012). Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 32, 2861-2870.
- Tapley, P., Lamballe, F., and Barbacid, M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7, 371-381.
- Tatebayashi, K., Takekawa, M., and Saito, H. (2003). A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J* 22, 3624-3634.
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., and Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* 26, 3521-3533.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Nagoya, M., Takayama, T., Nishimura, A., Sakurai, M., Momma, T., and Saito, H. (2015). Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain osmosensor Sho1. *Nat Commun* 6, 6975.
- Tatjer, L., Sacristán-Reviriego, A., Casado, C., González, A., Rodríguez-Porrata, B., Palacios, L., Canadell, D., Serra-Cardona, A., Martín, H., Molina, M., *et al.* (2016). Wide-Ranging Effects of the Yeast Ptc1 Protein Phosphatase Acting Through the MAPK Kinase Mkk1. *Genetics* 202, 141-156.
- Thorsen, M., Di, Y., Tangemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., Wagner, A., Johansson, E., Boman, J., Posas, F., *et al.* (2006). The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell* 17, 4400-4410.
- Timblin, B.K., Tatchell, K., and Bergman, L.W. (1996). Deletion of the gene encoding the cyclin-dependent protein kinase Pho85 alters glycogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 143, 57-66.
- Toker, A., and Newton, A.C. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103, 185-188.
- Tomishige, N., Noda, Y., Adachi, H., Shimoi, H., Takatsuki, A., and Yoda, K. (2003). Mutations that are synthetically lethal with a gas1Delta allele cause defects in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 269, 562-573.
- Tong, A.H., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., *et al.* (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303, 808-813.
- Torres, J., Di Como, C.J., Herrero, E., and De La Torre-Ruiz, M.A. (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem* 277, 43495-43504.
- Torres, L., Martín, H., García-Saez, M.I., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M., and Nombela, C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* lyt2 mutants. *Mol Microbiol* 5, 2845-2854.
- Truman, A.W., Kim, K.Y., and Levin, D.E. (2009). Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29, 6449-6461.
- Truman, A.W., Millson, S.H., Nuttall, J.M., King, V., Mollapour, M., Prodromou, C., Pearl, L.H., and Piper, P.W. (2006). Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slt2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell* 5, 1914-1924.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., *et al.* (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-627.
- Utsugi, T., Minemura, M., Hirata, A., Abe, M., Watanabe, D., and Ohya, Y. (2002). Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes Cells* 7, 1-9.
- Valdivia, R.H., and Schekman, R. (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10287-10292.

- Valdivieso, M.H., Mol, P.C., Shaw, J.A., Cabib, E., and Durán, A. (1991). CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 114, 101-109.
- van den Bout, I., and Divecha, N. (2009). PIP5K-driven PtdIns(4,5)P₂ synthesis: regulation and cellular functions. *J Cell Sci* 122, 3837-3850.
- van Drogen, F., and Peter, M. (2002). Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* 12, 1698-1703.
- Vázquez, M., Nogales-Cadenas, R., Arroyo, J., Botias, P., García, R., Carazo, J.M., Tirado, F., Pascual-Montano, A., and Carmona-Saez, P. (2010). MARQ: an online tool to mine GEO for experiments with similar or opposite gene expression signatures. *Nucleic Acids Res* 38, W228-232.
- Vega, R.B., Yang, J., Rothermel, B.A., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2002). Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem* 277, 30401-30407.
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., and Morano, K.A. (2012). Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 115-158.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13804-13809.
- Versele, M., Gullbrand, B., Shulewitz, M.J., Cid, V.J., Bahmanyar, S., Chen, R.E., Barth, P., Alber, T., and Thorner, J. (2004). Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15, 4568-4583.
- Versele, M., and Thorner, J. (2004). Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J Cell Biol* 164, 701-715.
- Versele, M., and Thorner, J. (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* 15, 414-424.
- Vida, T.A., and Emr, S.D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 128, 779-792.
- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem* 280, 9149-9159.
- Vrabioiu, A.M., and Mitchison, T.J. (2007). Symmetry of septin hourglass and ring structures. *J Mol Biol* 372, 37-49.
- Waltenberger, J., Uecker, A., Kroll, J., Frank, H., Mayr, U., Bjorge, J.D., Fujita, D., Gazit, A., Hombach, V., Levitzki, A., et al. (1999). A dual inhibitor of platelet-derived growth factor beta-receptor and Src kinase activity potentially interferes with mitogenic and mitogenic responses to PDGF in vascular smooth muscle cells. A novel candidate for prevention of vascular remodeling. *Circ Res* 85, 12-22.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C., and Walter, P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998-1003.
- Wang, W., and Malcolm, B.A. (1999). Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 26, 680-682.
- Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D., and Ota, I. (2001). Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* 21, 51-60.
- Warringer, J., Hult, M., Regot, S., Posas, F., and Sunnerhagen, P. (2010). The HOG pathway dictates the short-term translational response after hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell* 21, 3080-3092.
- Watanabe, Y., Irie, K., and Matsumoto, K. (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 15, 5740-5749.
- Watanabe, Y., Takaes, G., Hagiwara, M., Irie, K., and Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 17, 2615-2623.
- Weidner, J., Wang, C., Prescianotto-Baschong, C., Estrada, A.F., and Spang, A. (2014). The polysome-associated proteins Scp160 and Bfr1 prevent P body formation under normal growth conditions. *J Cell Sci* 127, 1992-2004.

- Westfall, P.J., and Thorner, J. (2006). Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress: use of an analog-sensitive HOG1 allele. *Eukaryot Cell* 5, 1215-1228.
- Willett, R., Kudlyk, T., Pokrovskaya, I., Schonherr, R., Ungar, D., Duden, R., and Lupashin, V. (2013). COG complexes form spatial landmarks for distinct SNARE complexes. *Nat Commun* 4, 1553.
- Williams, K.E., and Cyert, M.S. (2001). The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1p. *EMBO J* 20, 3473-3483.
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C.P., Burkholder, A., Knoche, K., and Ota, I. (2002). Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell* 1, 163-173.
- Wloka, C., and Bi, E. (2012). Mechanisms of cytokinesis in budding yeast. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 710-726.
- Woodgett, J.R. (2001). Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE* 2001, re12.
- Wu, C., Jansen, G., Zhang, J., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2006). Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev* 20, 734-746.
- Yamamoto, K., Tatebayashi, K., Tanaka, K., and Saito, H. (2010). Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Mol Cell* 40, 87-98.
- Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T., and Takai, Y. (1994). Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 125, 1077-1093.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., and Serrano, R. (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* 21, 920-929.
- Yoon, J.H., Choi, E.J., and Parker, R. (2010). Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 189, 813-827.
- Yoshida, S., Bartolini, S., and Pellman, D. (2009). Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev* 23, 810-823.
- Yoshida, S., Kono, K., Lowery, D.M., Bartolini, S., Yaffe, M.B., Ohya, Y., and Pellman, D. (2006). Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* 313, 108-111.
- Yoshida, S., Ohya, Y., Goebel, M., Nakano, A., and Anraku, Y. (1994). A novel gene, STT4, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 1166-1172.
- Young, M.E., Karpova, T.S., Brugger, B., Moschenross, D.M., Wang, G.K., Schneiter, R., Wieland, F.T., and Cooper, J.A. (2002). The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol Cell Biol* 22, 927-934.
- Yu, I.M., and Hughson, F.M. (2010). Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 137-156.
- Yuzyuk, T., Foehr, M., and Amberg, D.C. (2002). The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. *Mol Biol Cell* 13, 2869-2880.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., Nittler, M.P., and Lim, W.A. (2004). Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Mol Cell* 14, 825-832.
- Zhang, C., Lopez, M.S., Dar, A.C., Ladow, E., Finkbeiner, S., Yun, C.H., Eck, M.J., and Shokat, K.M. (2013). Structure-guided inhibitor design expands the scope of analog-sensitive kinase technology. *ACS Chem Biol* 8, 1931-1938.
- Zhang, X., Lester, R.L., and Dickson, R.C. (2004). Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem* 279, 22030-22038.
- Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A., and Guo, W. (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J Cell Biol* 180, 145-158.
- Zhao, C., Jung, U.S., Garrett-Engele, P., Roe, T., Cyert, M.S., and Levin, D.E. (1998). Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol* 18, 1013-1022.
- Zheng, S.T., Huo, Q., Tuerxun, A., Ma, W.J., Lv, G.D., Huang, C.G., Liu, Q., Wang, X., Lin, R.Y., Sheyhidin, I., et al. (2011). The expression and activation of ERK/MAPK pathway in human esophageal cancer cell line EC9706. *Mol Biol Rep* 38, 865-872.

- Ziman, M., Chuang, J.S., and Schekman, R.W. (1996). Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. Mol Biol Cell 7, 1909-1919.



ANEXO

Esta Tesis Doctoral ha dado lugar a:

- la Concesión con Examen Previo de la solicitud de Patente Nacional 201400935 titulada **“Construcción génica y métodos para detectar compuestos antifúngicos y antitumorales”**. Inventores: Martín Brieva, Humberto; **Alonso Rodríguez, Esmeralda**; Nombela Cano, César y Molina Martín, María.

- la publicación del artículo **Alonso-Rodríguez, E.**, Fernández-Piñar, P., Sacristán-Reviriego, A., Molina, M., and Martín, H. (2016). **“An Analog-Sensitive Version of the Protein Kinase Slt2 Allows Identification of Novel Targets of the Yeast Cell Wall Integrity Pathway”** *J Biol Chem.*, 291, 5461-72.

